

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE  
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss HIV-1 Gag abgeleiteter Virus-ähnlicher Partikel auf die  
Maturation und Aktivierung von humanen dendritischen Zellen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Simone Sertl

2011



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MEDIZINISCHE  
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE  
DIREKTOR: PROF. DR. DR. ANDRÉ GESSNER  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss HIV-1 Gag abgeleiteter Virus-ähnlicher Partikel auf die  
Maturation und Aktivierung von humanen dendritischen Zellen

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Simone Sertl

2011

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2012



**Meinen Eltern**

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
A.1. HIV und AIDS .....	1
A.1.1. Das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1).....	1
A.1.2. AIDS.....	3
A.1.2.1. Epidemiologie .....	3
A.1.2.2. Klinik und Therapie .....	3
A.2. Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV.....	4
A.2.1. Schwierigkeiten der HIV-Impfstoffentwicklung .....	4
A.2.2. Besondere Anforderungen an einen HIV-Impfstoff.....	5
A.2.3. Strategien zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV .....	7
A.2.3.1. Traditionelle Impfstoffkonzepte.....	7
A.2.3.2. Neue Strategien zur Impfstoffentwicklung .....	8
A.3. Virus-like particles (VLP) .....	9
A.3.1. Allgemeine Eigenschaften von VLP .....	9
A.3.2. VLP als Vakzine-Kandidaten .....	10
A.3.3. Allgemeine Eigenschaften von HIV Pr55 <sup>Gag</sup> VLP .....	11
A.3.3.1. Biologische Charakteristika des Pr55 <sup>Gag</sup> Polyproteins .....	11
A.3.3.2. Expression und Struktur von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP.....	12
A.3.4. Immunologische Eigenschaften von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP .....	14
A.3.4.1. Voraussetzungen zur Auslösung einer Immunantwort .....	14
A.3.4.2. T-Zell Epitope des Pr55 <sup>Gag</sup> Polyproteins.....	16
A.3.4.3. VLP-vermittelte Pr55 <sup>Gag</sup> Epitoppräsentation auf MHC-I und MHC-II Molekülen .....	16
A.3.4.4. Stimulation des angeborenen Immunsystems durch Pr55 <sup>Gag</sup> VLP ...	18
A.4. Zielsetzung .....	18
<b>B. Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
B.1. Material.....	20
B.1.1. Chemikalien .....	20
B.1.2. Eukaryontische Zelllinien .....	20
B.1.3. Nährmedien für eukaryontische Zellen.....	20
B.1.4. Plasmidvektoren.....	20
B.1.5. Oligonukleotide .....	21
B.1.6. DNA-/ Protein- Molekulargewichtsstandards.....	22
B.1.7. Virusstämme .....	22
B.1.8. Buffy Coat .....	22
B.2. Methoden.....	23
B.2.1. Zellkulturtechniken .....	23
B.2.1.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen .....	23
B.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl.....	23
B.2.2. Herstellung und Aufbereitung von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP in unterschiedlichen Expressionssystemen.....	23
B.2.2.1. Produktion von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP im Säuger-Expressionssystem .....	23
B.2.2.2. Produktion von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP im baculoviralen Expressionssystem...	24
B.2.2.3. Aufbereitung der Pr55 <sup>Gag</sup> VLP.....	24
B.2.3. Analyse der Pr55 <sup>Gag</sup> VLP .....	25

B.2.3.1. Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration.....	25
B.2.3.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
B.2.3.3. Färbung mit Coomassie Brilliant Blau.....	27
B.2.3.4. Westernblotanalyse .....	27
B.2.4. Labelling der Pr55 <sup>gag</sup> VLP .....	29
B.2.5. Baculovirus Titerbestimmung mittels FACS .....	30
B.2.6. Isolierung und Verarbeitung baculoviraler DNA .....	32
B.2.6.1. Isolierung von DNA aus Wildtyp-Baculoviren .....	32
B.2.6.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA .....	34
B.2.6.3. Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen oder Nuklease .....	34
B.2.6.4. PCR (polymerase chain reaction).....	35
B.2.6.5. Agarose-Gelelektrophorese.....	36
B.2.7. Limulus Amebocyte Lysate - Test .....	37
B.2.8. Isolierung und Aufreinigung von Primärzellen .....	37
B.2.8.1. Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) aus Buffy Coat .....	37
B.2.8.2. Isolierung von Monozyten (CD14 <sup>+</sup> -Zellen) aus PBMC.....	38
B.2.8.3. Generierung von MDDC (monocyte derived dendritic cells) aus Monozyten (CD14 <sup>+</sup> -Zellen) .....	39
B.2.8.4. Isolierung von pDC (plasmacytoid dendritic cells) aus PBMC .....	39
B.2.9. Stimulationsversuche .....	40
B.2.9.1. Stimulation der dendritischen Zellen mit verschiedenen Pr55 <sup>gag</sup> VLP .....	40
B.2.9.2. Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA.....	41
B.2.9.3. Quantifizierung der Oberflächenexpressionsmarker mittels FACS .....	42
B.2.9.4. Quantifizierung der Zytokinproduktion mittels ELISA.....	45
B.2.10. Elektronenmikroskopie.....	46
B.2.10.1. Aufbereitung der VLP für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen .....	46
B.2.10.2. Negative Staining .....	47
B.2.10.3. Immunogoldlabelling.....	47
B.2.10.4. Ultrastrukturelle Gewebe- bzw. Zelluntersuchung .....	48
B.2.11. Fluoreszenzmikroskopie .....	49
<b>C. Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
C.1. Etablierung eines ex vivo Modells humaner dendritischer Zellen .....	51
C.1.1. Reinheit der CD14 <sup>+</sup> Monozyten.....	51
C.1.2. Ausbeute an MDDC .....	52
C.1.3. Reinheit der pDC .....	53
C.2. Biochemische Analyse der Pr55 <sup>Gag</sup> VLP aus verschiedenen Expressionssystemen .....	54
C.2.1. Coomassie und Immunoblotanalysen von Säuger VLP .....	54
C.2.2. Coomassie und Immunoblotanalysen von baculoviralen VLP .....	56
C.2.3. Dichtebestimmung der verschiedenen Pr55 <sup>Gag</sup> VLP .....	58
C.3. Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften von baculoviralen VLP und Säuger-VLP .....	60
C.3.1. Stimulation von MDDC mit Säuger-VLP .....	61
C.3.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit Säuger-VLP .....	62
C.3.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit Säuger-VLP .....	64

C.3.2. Stimulation von MDDC mit baculoviralen VLP .....	64
C.3.2.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit baculoviralen VLP .....	65
C.3.2.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit baculoviralen VLP .....	67
C.3.3. Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen mit baculoviralen VLP .....	67
C.4. Reinheitsbestimmung der baculoviralen VLP .....	68
C.4.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen .....	68
C.4.2. Baculovirus Titerbestimmung .....	70
C.5. Immunstimulatorische Eigenschaften von Wildtyp Baculoviren .....	71
C.5.1. Stimulation von MDDC mit Wildtyp Baculoviren .....	71
C.5.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren ....	71
C.5.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren ....	72
C.5.2. Stimulation von MDDC mit verschiedenen Titern an Wildtyp Baculoviren .....	73
C.6. Untersuchung baculoviraler Bestandteile auf ihre immunstimulatorische Wirkung .....	74
C.6.1. Stimulation von MDDC mit Säuger-VLP mit baculoviralem Hüllprotein... 75	
C.6.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit pseudotypisierten Säuger-VLP .....	75
C.6.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit pseudotypisierten Säuger-VLP .....	77
C.6.2. Isolierung und Analyse von DNA aus Wildtyp Baculoviren .....	77
C.6.3. Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA .....	79
C.6.3.1. Maturation der MDDC nach Stimulation mit baculoviraler DNA .....	80
C.6.3.2. Aktivierung der MDDC nach Stimulation mit baculoviraler DNA .....	83
C.7. Untersuchung der Aufnahme von VLP durch MDDC .....	84
C.7.1. Aufnahme von CFDA gelabelten VLP durch MDDC .....	84
C.7.2. Aufnahme von baculoviralen VLP durch MDDC (elektronenmikroskopische Bilder) .....	86
<b>D. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
D.1. Einfluss von HIV Pr55 <sup>Gag</sup> VLP auf das angeborene Immunsystem .....	88
D.2. Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften von Pr55 <sup>Gag</sup> VLP aus zwei verschiedenen Expressionssystemen .....	89
D.2.1. Bedeutung der TLR-2 und TLR-4 Signalwege bei der Maturation und Aktivierung von MDDC durch bvVLP .....	90
D.3. Untersuchung der bvVLP Präparationen auf immunstimulatorische Bestandteile .....	91
D.3.1. Einfluss von Insektenzellbestandteilen auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC .....	91
D.3.2. Einfluss von kontaminierenden Baculoviren auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC .....	91
D.3.3. Bedeutung des baculoviralen Hüllproteins gp64 .....	93
D.3.4. Einfluss baculoviraler DNA auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC .....	94
D.4. Mögliche DNA-Erkennungswege des angeborenen Immunsystems .....	95
D.4.1. Aktuelle Kenntnisse über die TLR-9-abhängige und -unabhängige Erkennung von DNA .....	95
D.4.2. Erkennung baculoviraler DNA durch humane MDDC .....	97
D.5. Mögliche Wege der Aufnahme und Prozessierung der baculoviralen VLP ...	98

D.6. Ausblick .....	100
<b>E. Zusammenfassung .....</b>	<b>102</b>
<b>F. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>G. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>118</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>123</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>124</b>

## **A. Einleitung**

### **A.1. HIV und AIDS**

Es sind bereits 29 Jahre vergangen seit die Krankheit AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) zum ersten Mal beschrieben wurde. Seitdem arbeiten Forscher aus der ganzen Welt daran, Ursprung und Struktur des HI (humanes Immundefizienz)-Virus, Infektionsmechanismen, Übertragungswege, Immunantworten und Möglichkeiten zu Therapie und Prävention von AIDS aufzuklären. Obwohl dabei bereits einige Erfolge erzielt werden konnten, schreitet die Pandemie weiter fort. Das Virus schlägt den Menschen mit seinen eigenen Waffen, dem Immunsystem. Umso wichtiger erscheint es, weiter an der Entwicklung einer protektiven HIV-Vakzine zu arbeiten, um die weitere Verbreitung der Krankheit einzudämmen.

#### **A.1.1. Das humane Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1)**

Das humane Immundefizienzvirus Typ-1 gehört zur Gruppe der Lentiviren (Familie: *Retroviridae*) und wurde erstmals 1983 von den Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert Gallo aus Lymphozyten von AIDS-Patienten isoliert (Barré-Sinoussi et al. 1983, Gallo et al. 1983).

HIV-1 Partikel sind kugelförmig und besitzen einen Durchmesser von ca. 100 nm. Die Hüllmembran ist aus einer Lipid-Doppelschicht aufgebaut, in der 72 Glykoproteinkomplexe integriert sind. Diese bestehen aus dem externen Glykoprotein gp120 und dem Transmembranprotein gp41 (Gelderblom, 1991). Beide Proteine sind nicht-kovalent miteinander verbunden und bilden Trimere aus je drei gp120/gp41-Proteinkomplexen. Außerdem enthält die Virushülle zahlreiche Komponenten der Wirtszellmembran, wie HLA-Moleküle oder Komplementfaktoren (Aloia et al. 1993, Gelderblom et al. 1987, Arthur et al. 1992, Meerloo et al. 1993).

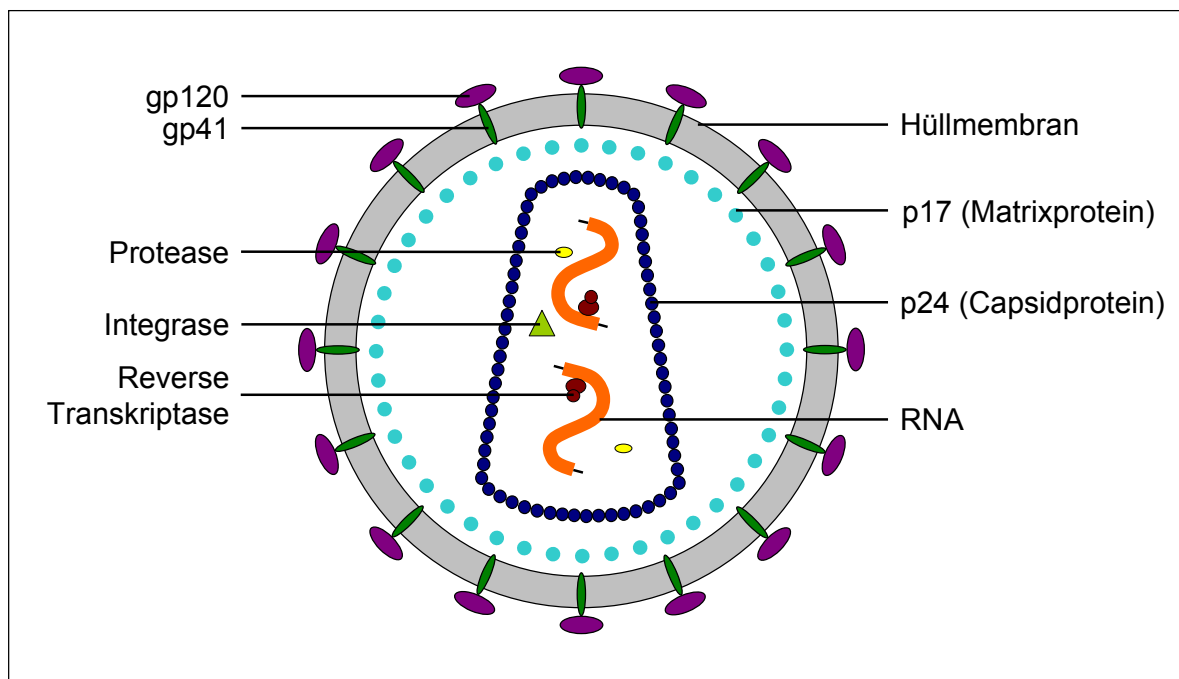


Abb. A.1: Schematische Darstellung eines HIV-1-Partikels

In der Lipid-Doppelschicht der Hüllmembran sind 72 Glykoproteinkomplexe integriert, welche jeweils aus dem externen Glykoprotein gp120 und dem Transmembranprotein gp41 bestehen. An der Innenseite der Virushülle befindet sich die aus dem Matrixprotein p17 aufgebaute Proteinschicht. Das konische Capsid im Partikelinneren ist aus dem Capsidprotein p24 aufgebaut und umschließt zwei identische RNA-Moleküle sowie die Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase.

Direkt an der Innenseite der Virushülle findet sich eine aus dem Matrixprotein p17 symmetrisch aufgebaute Proteinschicht, wobei die p17 Proteine durch einen Myristyl-Anker kovalent in der Lipidmembran verankert sind (Henderson et al. 1992, Veronese et al. 1988). Im Partikelinneren befindet sich ein konisches Capsid, das aus dem Capsidprotein p24 besteht und über das Link-Protein p6 mit der Virushülle verbunden ist (Gelderblom, 1991). Das Capsid umschließt zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA (Virusgenom) (Marquet et al. 1991) und mehrere Moleküle der Reversen Transkriptase (RT) / RNase H, Protease (PR) und Integrase (IN). Die RNA ist mit den Nucleocapsidproteinen p7 komplexiert. Zur Replikation benötigt das Virus zudem das Transaktivatorprotein Tat (*transactivator of transcription*) und das regulatorische Protein Rev (*regulator of expression of virion proteins*). Die akzessorischen Proteine Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein rapid*), Vpu (*viral protein out*) und Nef (*negative regulatory factor*) greifen in verschiedene Signalkaskaden ein und beeinflussen die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel.

Tat, Rev und Nef befinden sich nicht in den Virionen, werden aber früh während der Infektion gebildet (Barré-Sinoussi, 1996).

## **A.1.2. AIDS**

### **A.1.2.1. Epidemiologie**

Die HIV-Pandemie gehört weiterhin zu den weltweit größten Bedrohungen für die öffentliche Gesundheit. Nach Angaben von UNAIDS haben sich im Jahr 2009 2,6 Millionen Menschen neu mit dem HI-Virus (humanes Immundefizienzvirus) infiziert. Derzeit leben weltweit etwa 33,3 Millionen Menschen mit HIV/AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*), unter den Betroffenen sind 15,9 Millionen Frauen und 2,5 Millionen Kinder (Stand: 2010) ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)). Mehr als ein Drittel aller HIV-infizierten Menschen leben in Afrika südlich der Sahara.

In Deutschland leben nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts (Stand: Ende 2010) etwa 70.000 Träger des HI-Virus. Die Rate der Neuinfektionen im Jahr 2010 wird auf 3.000 geschätzt ([www.rki.de](http://www.rki.de)).

### **A.1.2.2. Klinik und Therapie**

Bei der primären Infektion mit HIV kommt es zur Ausbreitung des Virus im lymphatischen Gewebe einhergehend mit einem deutlichen Abfall der T-Helfer-Zellzahl, einer hohen Virämie (Viruslast) und damit auch einer hohen Infektiosität. Etwa die Hälfte der Patienten entwickelt wenige Wochen nach der Ansteckung ein so genanntes akutes retrovirales Syndrom mit Fieber, Nachtschweiß, Lymphknotenschwellungen, Pharyngitis und Exanthemen. Nach einigen Tagen bis Wochen bilden sich diese klinischen Veränderungen wieder zurück.

Danach beginnt das asymptomatische Stadium (klinische Latenz), in dem die Patienten über mehrere Jahre keinerlei Beschwerden haben. In diesem Stadium nimmt die Virämie ab und stellt sich auf ein individuelles Niveau ein, was einen maßgeblichen Parameter für die weitere Prognose darstellt.

Im symptomatischen Stadium hat schließlich die Zahl der T-Helfer-Zellen soweit abgenommen, dass es zu opportunistischen Infektionen kommt. Die schweren AIDS-definierenden Erkrankungen treten in der Regel dann auf, wenn die CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen unter 200/µl gesunken sind.



Als Therapie der HIV-Infektion steht heute die hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) zur Verfügung. Diese besteht typischerweise aus einer Kombination von zwei nukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und einem Protease-inhibitor (PI) oder einem nichtnukleosidalen Reverse-Transkriptase-Inhibitor (NNRTI). Jedoch kann durch keine bisher bekannte Therapie eine vollständige Elimination der HI-Viren erreicht werden. Zudem verhindern die hohen Kosten den breiten Einsatz von HAART in den am stärksten betroffenen Regionen. Daher ist die Entwicklung einer effektiven Vakzine als Schutz vor Übertragung des HI-Virus notwendig.

## **A.2. Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV**

### **A.2.1. Schwierigkeiten der HIV-Impfstoffentwicklung**

HIV-1 weist einige Besonderheiten auf, die es schwierig machen einen effektiven Impfstoff zu entwickeln. Das hierbei wahrscheinlich größte Problem stellt die große Heterogenität des Virus dar, die aufgrund der fehlerhaften Replikation durch die Reverse Transkriptase entsteht. Dieses Enzym arbeitet so ungenau, dass fast bei jedem neu produzierten Virion eine Mutation vorliegt und somit bei infizierten Personen jeden Tag unzählige neue virale Partikel gebildet werden (Preston et al. 1988). Das Ergebnis ist die Erschaffung von *Quasi-Spezies* von Viren, die heterogene Antigeneigenschaften zeigen (Malim et al. 2001). Doch obwohl HIV-1 Isolate so außergewöhnlich unterschiedlich sind, kann man sie trotzdem in verschiedene Gruppen, so genannte *Clades* oder Subtypen, einteilen. So kommt z.B. *Clade B* vor allem in den westlichen Ländern vor, *Clade C* dagegen in afrikanischen Ländern südlich der Sahara. Jeder Ansatz für eine neue Impfstoff-Entwicklung sollte dieses Spektrum an unterschiedlichen Antigenen berücksichtigen.

Des Weiteren hat das HI-Virus Mechanismen entwickelt um die Reaktionen des menschlichen Immunsystems zu umgehen. Dazu gehören die Herabregulation von *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I Molekülen und damit die Reduktion der Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sowie die Bildung von *Escape-Varianten*, welche sowohl den CTL-Antworten (Evans et al. 2001, O'Connor et al. 2001, Goulder et al. 2004, Feeney et al. 2005) als auch der Erkennung durch neutralisierende Antikörper (Richman et al. 2003, Wei et al. 2003) entgehen können. HIV-1 integriert als eine latente provirale DNA in das Genom von langlebigen Gedächtnis-CD4<sup>+</sup> T-Zellen und schafft somit ein persistierendes Reservoir an Viren,

das sich der Kontrolle des Immunsystems entzieht. Berechnungen ergaben, dass die Eradikation eines Reservoirs von nur  $1 \times 10^5$  Zellen etwa 60 Jahre dauern würde (Finzi et al. 1999). Daher ist das Zeitfenster für die Wirkmechanismen einer HIV-Vakzine streng auf die frühe Phase der Infektion begrenzt, bevor das Virus in lymphatische Organe streuen kann (Miller et al. 2005, Gallo, 2005).

Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Das HIV-1 Env Glykoprotein bildet auf der Oberfläche des Virus Trimere mit ausgeprägter N-Glykosylierung, wodurch viele konservierte Epitope vor der Erkennung durch Antikörper abgeschirmt werden (Kwong et al. 1998, Wyatt et al. 1998). Stark immunogene variable Loops lösen die Produktion spezifischer Antikörper aus und können so die humorale Immunantwort von den konservierten Regionen ablenken. Außerdem werden hochkonservierte Epitope wie die Chemokin-Korezeptorbindestelle erst nach einer Konformationsänderung, die durch die Bindung von Env an den zellulären CD4-Rezeptor ausgelöst wird, ausgebildet (Chen et al. 2005). Die CD4-Bindestelle selbst ist zwar ein Ziel für umfassend reaktive neutralisierende Antikörper (Sather et al. 2009, Scheid et al. 2009, Li et al. 2009, Binley et al. 2008), liegt jedoch in einer Tasche des Env-Moleküls versteckt und ist somit schwer zugänglich (Zhou et al. 2007).

Insgesamt bleibt unklar, welche Art von Immunreaktion ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit HIV-1 bietet, da infizierte Patienten das Virus nicht eliminieren können. Hinweise auf eine solche protektive Immunantwort könnten aus Studien mit Primaten und HIV-1 infizierten Personen, die spontan eine Kontrolle der Virusreplikation auf sehr niedrige Levels entwickeln, gezogen werden. Jedoch werden wahrscheinlich nur erfolgreiche Vakzine-Wirksamkeitsstudien im menschlichen Organismus definitive Ergebnisse liefern (Barouch, 2008).

### **A.2.2. Besondere Anforderungen an einen HIV-Impfstoff**

Da HIV-1 sowohl über Schleimhautkontakt (sexuelle Übertragung) als auch parenteral (i.v.-Drogenmissbrauch, kontaminierte Blutprodukte) oder vertikal (von der Mutter auf das Kind) übertragen wird, sollten durch eine Impfung mukosale und systemische Immunantworten ausgelöst werden. Außerdem verbreitet sich HIV-1 als freies oder zellgebundenes Virus, so dass Abwehrmechanismen benötigt werden, die extra- und intrazellulär wirken, um die Verbreitung aufzuhalten (Phillips et al. 1994).

Daher ist es wichtig sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten zu aktivieren.

Virusspezifische neutralisierende Antikörper-Titer spielen eine zentrale Rolle bei den meisten zugelassenen viralen Impfstoffen. Daher konzentrierten sich frühe Studien auf die Entwicklung von HIV-1-Env-Untereinheit-Immunogenen. Daten aus nicht-humanen Primatenstudien zeigten, dass der Transfer von neutralisierenden Antikörpern passiven Schutz vor einer Infektion bot und legten so das Potential einer virusspezifischen humoralen Immunität dar (Baba et al. 2000, Mascola et al. 2000). Ein weiterer Hinweis auf die Rolle von HIV-1 neutralisierenden Antikörpern *in vivo* ist die schnelle und andauernde Selektion von *Antikörper-Escape-Varianten* im Verlauf der Infektion (Richman et al. 2003, Wei et al. 2003). Jedoch bestehen weiter Zweifel daran, dass ein Impfstoff allein durch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern Schutz vor einer Infektion bieten kann (Girard et al. 2006).

Deshalb haben sich neuere Ansätze zur Impfstoffentwicklung auf zelluläre Immunantworten konzentriert (Emini et al. 2004, Garber et al. 2004, McMichael et al. 2001, McMichael et al. 2002, Letvin, 2002). Anhaltspunkte für die Bedeutung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kontrolle der Virusreplikation bieten die zeitliche Korrelation zwischen dem Auftreten von HIV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der Abnahme der primären Virämie (Koup et al. 1994, Kuroda et al. 1999), die Tatsache, dass bestimmte HLA Klasse I Allele (HLA-B57, HLA-B27, HLA-B63) mit langsamer Krankheitsprogression verbunden sind (Frahm et al. 2005), die frühe Selektion von *CTL-Escape-Varianten* während der primären Infektion (Borrow et al. 1997, Evans et al. 1999, Allen et al. 2000, Barouch et al. 2002) und der schnelle Anstieg der Viruslast in Makaken, die nach Depletion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) infiziert wurden (Matano et al. 1998, Schmitz et al. 1999, Lifson et al. 2001). Wenn auch die Induktion einer zellulären Immunantwort, insbesondere einer CD8<sup>+</sup> CTL Antwort, keinen kompletten Schutz vor einer Infektion bietet, so könnte sie doch eine Kontrolle der Virusreplikation nach Infektion ermöglichen, die Viruslast reduzieren, die Krankheitsprogression verlangsamen und die Möglichkeit der weiteren Transmission des Virus reduzieren (Girard et al. 2006).

### A.2.3. Strategien zur Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV

#### A.2.3.1. Traditionelle Impfstoffkonzepte

Traditionelle Impfstrategien wie attenuierte oder inaktivierte Viren und rekombinante Proteine schützen den Menschen vor einer Vielzahl an Viruserkrankungen wie z.B. Pocken, Masern, Poliomyelitis, Tollwut oder Hepatitis B. Diese Impfstoffkonzepte erwiesen sich jedoch nicht als Erfolg versprechend gegen HIV-1.

Lebend attenuierte Viren erfüllen nicht die Sicherheitsanforderungen, da die Gefahr der Rückmutation oder Rekombination mit anderen Retroviren besteht. Im Makaken-Modell konnte beobachtet werden, dass Gen-deletierte Mutanten des *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) zum Krankheitsausbruch führten (Baba et al. 1999). Zwar können zusätzliche Deletionen oder Mutationen zu weiterer Attenuierung des Virus führen, dies geschieht jedoch auf Kosten der Effektivität des Impfstoffs (Johnson et al. 1999, Guan et al. 2001, Blancou et al. 2004). Die Tiermodelle zeigen außerdem, dass ein attenuiertes Virus nur dann ausreichenden Schutz gewährt, wenn es auf einem geringen aber konstanten Level replizieren kann. Doch auch dieses geringe Level könnte über längere Zeit dem Virus die Möglichkeit verschaffen, zu pathogenen Varianten zurückzumutieren (Singh, 2006).

Chemisch inaktivierte Viren induzierten in Affen zwar Immunität gegen SIV (Lifson et al. 2004), doch die Immunantwort war sowohl in ihrer Dauer als auch im Spektrum sehr begrenzt und nicht effektiv gegen genetisch verschiedene Virusisolate. Außerdem wurden durch inaktivierte HIV-Impfstoffe keine CTL-Antworten ausgelöst (Singh, 2006). Daher besteht wenig Hoffnung, dass dieses Konzept in der HIV-Impfstoffforschung weiterführend ist.

Auch aufgereinigte virale Proteine, die in Bakterien- oder Säugerzellen unter der Verwendung von rekombinanter DNA exprimiert wurden, lösen keine breit reaktiven neutralisierenden Antikörper- oder CTL-Antworten aus (Flynn et al. 2005, Pitisuttithum et al. 2006) und erzeugen keine Immunität gegen genetisch unterschiedliche HIV-Isolate. Neuere Daten deuten jedoch darauf hin, dass *Toll-like-Rezeptor (TLR) Adjuvantien* die Wirksamkeit von Protein-Untereinheiten-Immuno- genen verbessern könnten (Wille-Reece et al. 2005, Wille-Reece et al. 2006).

Da diese traditionellen Impfstoffkonzepte keinen Erfolg brachten, mussten neue Strategien entwickelt werden.

### A.2.3.2. Neue Strategien zur Impfstoffentwicklung

Neue Konzepte befassen sich mit lebend rekombinanten viralen und bakteriellen Vektoren und Plasmid-DNA als eine Möglichkeit, dem Immunsystem HIV-1-Antigene zu präsentieren.

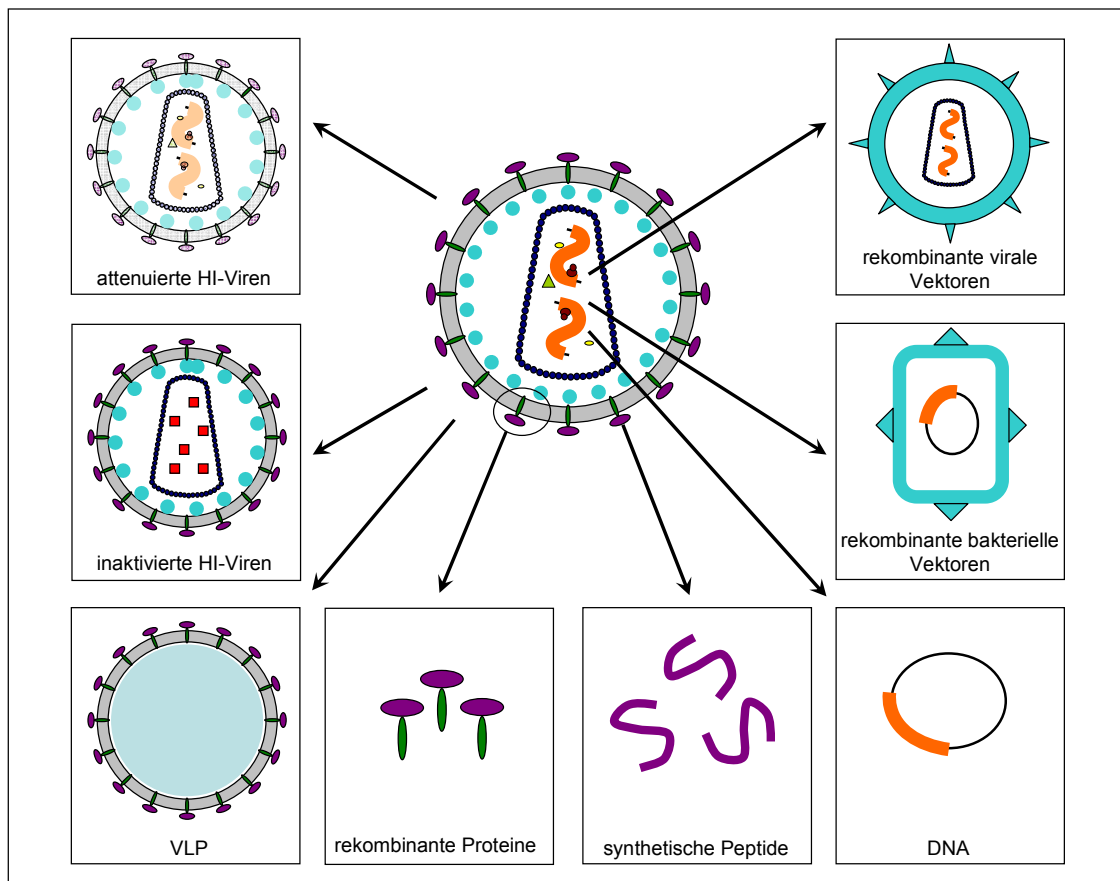


Abb. A.2: Darstellung verschiedener Vakzine-Strategien gegen HIV

Die DNA-Vakzine ist eine einfache und vielseitige Möglichkeit für die Herstellung von Impfstoffen. Diese Art der Immunisierung benutzt einen exprimierenden Plasmidvektor, welcher die gewünschte DNA-Sequenz für das immunogene Protein trägt. Um jedoch eine messbare Immunantwort in nicht-humanen Primaten sowie im Menschen zu erzeugen, müssen hohe Dosen an DNA-Vakzine eingesetzt werden (Casimiro et al. 2003, Graham et al. 2006). Daher beschäftigt sich die Forschung vermehrt mit der Entwicklung von Adjuvanzen für DNA-Impfstoffe (Barouch et al. 2000, Chong et al. 2007) und der Erhöhung der Immunogenität, z.B. durch *in vivo* Elektroporation (Liu et al. 2008).

Die Gene von HIV und SIV können auch in Mikroorganismen, die als sichere und effektive lebend attenuierte Impfstoffe gelten, exprimiert werden. Allen voran werden

hierfür Adeno- (Priddy et al. 2008, Shiver et al. 2002, Catanzaro et al. 2006) und Pockenviren (Amara et al. 2002, Harari et al. 2008) verwendet. Virale Vektoren, alleine oder als *DNA prime/vector boost Strategien*, sind derzeit die Impfstoffe, die in den meisten klinischen HIV-Vakzine Studien verwendet werden (Barouch, 2008). Es werden aber auch bakterielle und mycobakterielle Vektoren wie Salmonellen, Listerien oder Bacillus Calmette-Guérin (BCG) untersucht (Barouch, 2008). Allerdings mussten auch einige Studien aufgrund von Nebenwirkungen des eingesetzten Vektors gestoppt werden (Singh, 2006). Merck musste im September 2007 die so genannte STEP Studie (Phase 2b), bei der rekombinante Adenovirus Vektoren eingesetzt wurden, vorzeitig beenden. Das Problem war nicht nur, dass bei einigen Teilnehmern präexistente neutralisierende Antikörper gegen den viralen Vektor vorhanden waren, sondern es zeigte sich sogar eine erhöhte HIV-1 Infektionsrate bei diesen Probanden (Buchbinder et al. 2008).

Eine weitere Möglichkeit einer HIV-Vakzine stellen virusähnliche Partikel (*virus-like particles* (VLP)) dar. Diese bestehen nur aus den viralen Hüll- und/oder Capsidproteinen und ähneln somit den nativen Viren. VLP haben den Vorteil, dass sie stärker immunogen sind als ihre löslichen Protein-Untereinheiten und trotzdem eine hohe Sicherheit bieten. Neben einer humoralen Immunantwort induzieren VLP auch eine effiziente zelluläre Reaktion und erfüllen somit wichtige Anforderungen an einen HIV-Impfstoff.

### **A.3. Virus-like particles (VLP)**

#### **A.3.1. Allgemeine Eigenschaften von VLP**

Die Strukturproteine von vielen Viren können sich spontan zu Partikeln zusammenlagern, die den nativen Viren ähneln, ohne jedoch die für eine Infektion notwendigen Nukleinsäuren zu enthalten. Diese virusähnlichen Partikel (*virus-like particles* (VLP)) haben eine Größe von 22 – 150 nm, wobei ihre genaue Größe und Morphologie von den jeweiligen inkorporierten viralen Proteinen abhängen (Grgacic et al. 2006). Obwohl sie nicht infektiös und replikationsinkompetent sind, können VLP in Zielzellen eindringen und starke Immunantworten hervorrufen. Solche Partikel kommen auch bei natürlichen Infektionen vor, wo ihre Aufgabe darin besteht, die Immunantworten des Wirts vom eigentlichen Infektionsgeschehen wegzulocken (Ludwig und Wagner, 2007). Dies wurde vor allem für das Hepatitis B Virus (HBV)

beschrieben. Im Blutplasma von Patienten, die mit HBV infiziert sind, fanden sich große Mengen an 22 nm großen Partikeln, die nur aus dem HBs (Hepatitis B *surface*)-Antigen bestanden. Diese HBsAg-Partikel wurden aus dem Plasma isoliert und stellten die erste Generation von HBV-Impfstoffen dar (Blumberg et al. 1985).

### **A.3.2. VLP als Vakzine-Kandidaten**

VLP sind viel versprechende Kandidaten für die Herstellung von Impfstoffen gegen diverse Krankheitserreger. Aufgrund ihrer partikulären Struktur und der Möglichkeit, dem Immunsystem wiederholt die gleichen Epitope in hoher Dichte zu präsentieren, sind sie in der Lage, starke Immunantworten auszulösen. Außerdem scheint die Größe der Partikel von durchschnittlich 40 nm optimal für die Aufnahme von Nanopartikeln durch dendritische Zellen zu sein (Fifis et al. 2004).

Die Frage nach höheren Ausbeuten an HBsAg-Partikeln als jene, die aus Blutplasma HBV-Infizierter aufgereinigt wurden, führte bald zur Suche nach effizienteren Produktionssystemen. Mithilfe der Möglichkeiten der Gentechnologie wurden HBsAg-Partikel aus rekombinanten Hefezellen freigesetzt, wobei große Mengen des Impfstoffs in hoher Reinheit gewonnen werden konnten (McAleer et al. 1984). Neben Hefezellen werden inzwischen auch andere Systeme, wie das Vacciniavirus-Expressionssystem, die Transfektion von Säugerzellen mit RNA oder Codon-optimierter DNA oder die Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren zur Produktion von VLP genutzt. Für die Herstellung von VLP zur mukosalen Impfung können auch Darmbakterien wie attenuierte *Salmonella*- oder *Lactobacillus*-Stämme verwendet werden (Karpenko et al. 2004, Aires et al. 2006). Für Schluckimpfungen gegen HBV und Norwalkvirus wurden VLP auch mithilfe von verschiedenen Pflanzen wie z.B. Tabak, Salatblättern oder Kartoffeln produziert (Kong et al. 2001, Tacket et al. 1998, Mason et al. 1996).

Ein weiteres prominentes Beispiel einer VLP Vakzine ist der HPV (Humanes Papilloma Virus) Impfstoff. Die Expression des Capsidproteins L1 von HPV in Hefezellen führt zu einer Zusammenlagerung der Proteine zu VLP. Diese sind in der Lage, schützende Immunantworten gegen die kanzerogenen HPV Subtypen 16 und 18 auszulösen und stellen somit eine sichere, gut verträgliche und stark immunogene Vakzine dar. Die Zulassung dieses Impfstoffs erfolgte im Jahre 2006 (Garland et al.

2007). Ebenso konnten HPV VLP mithilfe des Baculovirus-Expressionssystems hergestellt werden (Paavonen et al. 2007).

Auch im Falle von HIV werden VLP als mögliche Impfstoffkandidaten diskutiert. Das HIV-1 Pr55<sup>Gag</sup> Polyprotein lagert sich selbst zu partikulären Strukturen zusammen (Gheysen et al. 1989, Vernon et al. 1991, Wagner et al. 1992). Diese Pr55<sup>Gag</sup> VLP können sehr effizient in Säuger- oder Insektenzellen produziert werden. Erste Immunisierungsstudien zeigten starke humorale und zelluläre Immunantworten und Gag-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) in Mäusen und Makaken (Wagner et al. 1994, Paliard et al. 2000). Außerdem aktivieren Pr55<sup>Gag</sup> VLP Zellen des angeborenen Immunsystems (Deml et al. 2005, Buonaguro et al. 2006, Speth et al. 2008).

### **A.3.3. Allgemeine Eigenschaften von HIV Pr55<sup>Gag</sup> VLP**

#### **A.3.3.1. Biologische Charakteristika des Pr55<sup>Gag</sup> Polyproteins**

Das HIV-1 Gag Gen codiert für das hochkonservierte Gag Polyprotein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (Pr55<sup>Gag</sup> Protein), das die Zusammenlagerung der Virionen steuert und die Strukturproteine p17 Matrix (MA), p24 Capsid (CA), p7 Nukleocapsid (NC) und p6 Linker (LI) sowie die Peptide p1 und p2 enthält. Während oder kurz nach der Knospung von unreifen Virionen aus der Wirtszelle spaltet die virale Protease das Gag Polyprotein in seine einzelnen Komponenten. Werden unprozessierte Gag Vorläuferproteine in eukaryotischen Zellen exprimiert, lagern sie sich auch in Abwesenheit jeglicher anderer viraler Proteine oder viraler RNA an die Zytoplasmamembran an und schnüren sich als kleine virusähnliche Partikel ab (Delchambre et al. 1989, Karacostas et al. 1989, Wagner et al. 1992, Mergener et al. 1992).

Die Membran bindende Region des Gag Proteins liegt in bestimmten Domänen innerhalb des p17 Matrixproteins. Der N-terminale Glycinrest, an den die Myristylsäure gekoppelt wird, ist essentiell für die Zusammenlagerung und die Bindung des Gag Proteins an die Innenseite der Zytoplasmamembran (Gheysen et al. 1989, Bryant et al. 1990, Pal et al. 1990, Freed et al. 1994). Zusätzlich wird die Membranverankerung von Gag durch elektrostatische Wechselwirkungen unterstützt, die zwischen den basischen Resten innerhalb des N-Terminus des p17 Proteins und negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran auftreten (Yuan et al. 1993,



Zhou et al. 1994). Jedoch konnte gezeigt werden, dass die p17 Interaktionen nicht essentiell für die Zusammenlagerung sind, da Gag immer noch Partikel bilden kann, wenn alle p17 Domänen außer dem Myristylierungssignal entfernt wurden (Wang et al. 2000).

Neben dem p17 Matrixprotein spielt für die korrekte Bildung von VLP auch das p24 Capsidprotein eine wichtige Rolle. Mutationsanalysen weisen auf eine Dimerisierungsdomäne im C-terminalen Bereich des p24 hin, die essentiell für die Gag Multimerisation und die Zusammenlagerung ist (Jowett et al. 1992, Hong et al. 1993, von Pöbltzki et al. 1993, Kattenbeck et al. 1997). Hingegen hatten Modifikationen in der N-terminalen Hälfte des p24 Proteins keinen ausgeprägten Einfluss auf die Partikelproduktion (Jowett et al. 1992, von Pöbltzki et al. 1993).

Die p7 Domäne des Gag Proteins beinhaltet eine stark basische Region, die für die Verpackung und den Schutz der viralen RNA verantwortlich ist. Pro Viruspartikel werden zwei Kopien des RNA-Genoms verpackt. Dabei ist die RNA so bedeutsam, dass andere zelluläre RNA-Moleküle rekrutiert werden, wenn keine virale RNA zur Verfügung steht (Khorchid et al. 2002). Des Weiteren scheint p7 für die Zusammenlagerung der Partikel wichtig zu sein, da p7 Mutanten schwere Fehler in der Partikelbildung aufweisen (Dorfman et al. 1993, Hong et al. 1993). Zudem fanden sich Hinweise auf eine Interaktionsdomäne innerhalb des p7, welche die Gag Multimerisation vermittelt (Franke et al. 1994, Sandefur et al. 1998).

Im Gegensatz zu den anderen Gag Domänen scheint p6 keine Rolle bei der Partikelbildung und -Freisetzung aus Säuger- und Insektenzellen zu spielen (Hoshikawa et al. 1991, Royer et al. 1991, Jowett et al. 1992).

#### **A.3.3.2. Expression und Struktur von Pr55<sup>Gag</sup> VLP**

Wird das HIV-1 Gag Gen in geeigneten eukaryotischen Zellen exprimiert, so erfolgt die Synthetisierung des Gag Polyproteins an zytosolischen Ribosomen. Nach der Rekrutierung von einzelsträngiger RNA aggregiert das Pr55<sup>Gag</sup> Protein an der Innenseite der Zellmembran zu dichten Ansammlungen, die man gut unter dem Elektronenmikroskop erkennen kann (Abb. A.3 (D)). Dabei entstehen zunächst Ausstülpungen der Zellmembran, die sich schließlich als virusähnliche Partikel abschnüren (Abb. A.3 (E)). Somit erhalten die VLP eine Lipidhülle, in die auch

zelleigene membranständige Proteine verpackt werden (Gelderblom et al. 1987, Arthur et al. 1992, Meerloo et al. 1993).

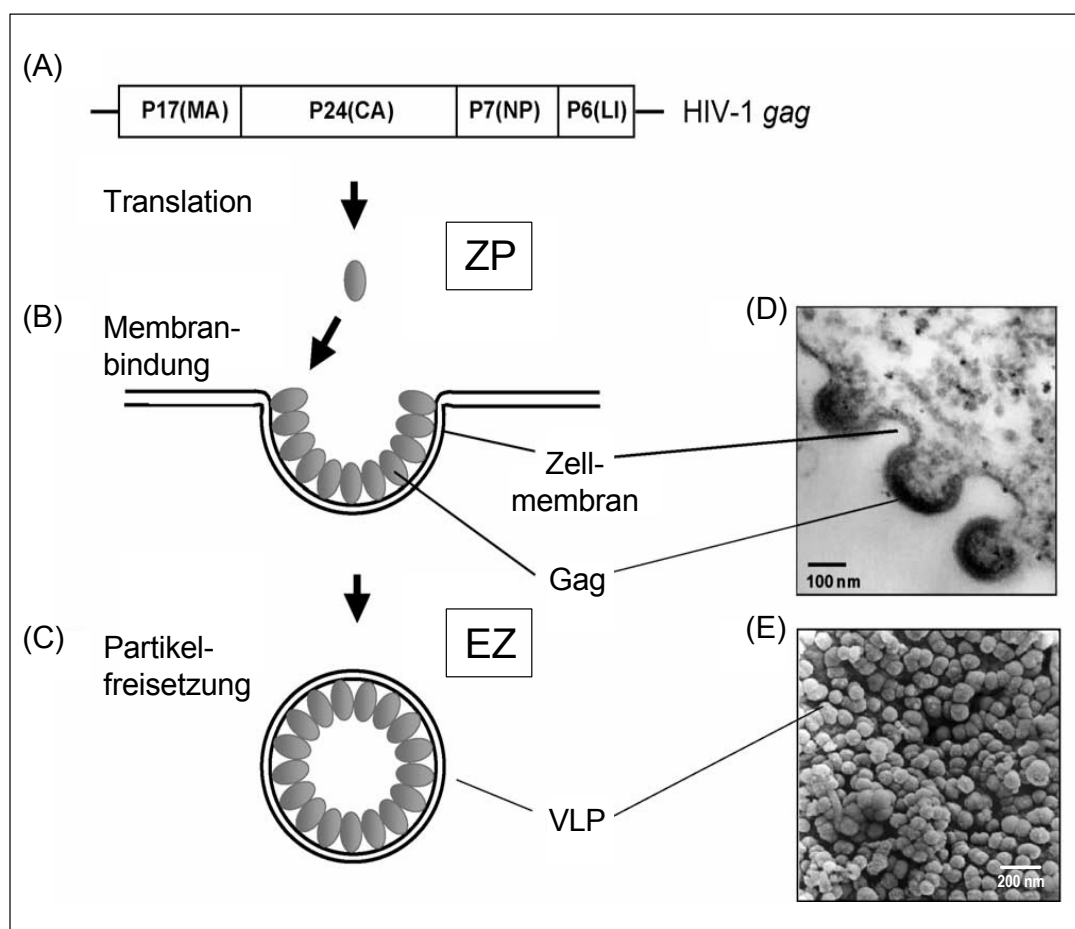


Abb. A.3: Schematische Darstellung des HIV Gag Polyproteins und der Partikelformation

- (A) Das HIV Pr55<sup>Gag</sup> Polyprotein besteht aus dem p17 Matrix (MA)-, dem p24 Capsid (CA)-, dem p7 Nukleo (NC)- und dem p6 Linker (LI)-Protein.
- (B) Die HIV Pr55<sup>Gag</sup> Polyproteine lagern sich an die Zellmembran an.
- (C) Nach dem *Budding* erfolgt die Partikelfreisetzung in den Extrazellulärraum.
- (D/E) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VLP, die sich von High Five<sup>TM</sup> Insektenzellen nach Infektion mit Gag-rekombinanten Baculoviren abschnüren.

Abkürzungen: ZP: Zytoplasma; EZ: Extrazellulärraum

(Abbildung in Anlehnung an Deml et al. 2005)

Pr55<sup>Gag</sup> VLP können relativ einfach mit verschiedenen Expressionssystemen wie dem Baculovirus-Expressionssystem (Gheysen et al. 1989, Royer et al., 1992, Wagner et al. 1996, Tobin et al. 1996), dem Vacciniavirus-Expressionssystem (Haffar et al. 1990, Vzorov et al. 1991), mithilfe von stabil transfizierten Hefe-Spheroblasten (Sakuragi et al. 2002), Verozellen (Rovinski et al. 1992), COS-7 oder 293T-Zellen

(Young et al. 2004) hergestellt werden. Hierbei weisen die beschriebenen Expressionssysteme jedoch bezüglich der erzielten Ausbeuten und der Reinheit der VLP Chargen erhebliche Unterschiede auf. Die Partikel können auf einfache Weise mittels Ultrazentrifugation in Saccharose- und Optiprep-Gradienten aufgereinigt werden, wobei ein Reinheitsgrad von über 80% erreicht wird. So produzierte VLP weisen einen Durchmesser von etwa 100 bis 120 nm auf und beinhalten etwa 1500 bis 1800 Pr55<sup>Gag</sup> Moleküle. Außerdem ähneln sie sowohl morphologisch als auch in Bezug auf ihre Eigenschaft als Antigene den nativen Virionen (Haffar et al. 1990, Wagner et al. 1992).

### **A.3.4. Immunologische Eigenschaften von Pr55<sup>Gag</sup> VLP**

#### **A.3.4.1. Voraussetzungen zur Auslösung einer Immunantwort**

Um eine Immunantwort auszulösen muss ein Antigen von antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder auch B-Zellen aufgenommen und prozessiert werden. Die Art der Immunantwort hängt maßgeblich davon ab, in welcher Weise die Antigene den T-Zellen präsentiert werden. Einfach dargestellt gelangen lösliche, extrazelluläre Antigene in der Regel in den exogenen Prozessierungs- und Präsentationsweg, woraus eine Epitoppräsentation auf MHC Klasse-II Molekülen zur Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Helfer Zellen resultiert. Der Abbau von intrazellulär synthetisierten Antigenen erfolgt dagegen über den endogenen Weg. Dieser führt zur Beladung von MHC Klasse I Molekülen mit den entstandenen Peptidfragmenten und damit zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen (CTL). In der Realität sind diese Vorgänge jedoch wesentlich komplexer. So können APC, insbesondere dendritische Zellen, in vivo eine große Anzahl von exogenen Antigenen unterschiedlichster Herkunft, wie von sterbenden Zellen, Bakterien, inaktivierten Viren, Liposomen oder VLP, über alternative Antigen-Prozessierungswege so verarbeiten, dass Peptide auf MHC-I-Moleküle gelangen (Yewdell et al. 1999, Reimann et al. 1999, Heath et al. 2001). Dies kann beispielsweise durch die Freisetzung endozytierter exogener Proteine ins Zytoplasma (Grommé et al. 2002, Zinkernagel, 2002, Melief, 2003, Brossart et al. 1997) und eine nachfolgende Epitopbeladung von MHC-I Molekülen über den endogenen Präsentationsweg geschehen. Alternativ ist eine direkte Beladung der MHC-I Moleküle mit in endolysosomalen Kompartimenten erzeugten Peptiden denkbar (Harding et al. 1994,

Stober et al. 2002). Dies könnte z.B. in den Endolysosomen selbst geschehen, nachdem MHC-I Moleküle von der Zelloberfläche internalisiert wurden.

Neben einer effizienten Epitoppräsentation auf MHC-I bzw. II Molekülen erfordert die Aktivierung von T-Zellen zudem ein zweites Signal. Dieses wird durch die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen auf den APC und deren Liganden auf den T-Zellen hervorgerufen. Fehlt das kostimulatorische Signal entsteht eine immunologische Toleranz.

Eine große Anzahl von Pathogen-assoziierten, molekularen Mustern (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), wie Nukleinsäuren (z.B. unmethylierte CpG-haltige Nukleinsäuren aus Bakterien- und Insektenzellen), Lipopolysaccharide (LPS), mikrobielle Polypeptide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Glukane und Mannane werden durch das angeborene Immunsystem als Alarmsignale erkannt. Die zelluläre Immunaktivierung als Antwort auf PAMPs wird bei Vertebraten von einer Familie von transmembranen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) vermittelt (Rock et al. 1998, Aderem et al. 2000, Janeway et al. 1998). Zu diesen PRRs gehört auch die Familie der *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), die sich auf Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen finden. Eine wichtige Folge der Erkennung von Pathogenen oder ihrer Bestandteile durch TLRs ist die Reifung, Aktivierung und das Überleben von wichtigen Komponenten des zellulären Immunsystems, wie z.B. APC (*antigen presenting cells*) (Hartmann et al. 1999), sowie die Aktivierung proinflammatorischer Prozesse (Aderem et al. 2000). Die Erkennung von PAMPs induziert in APC die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle, einschließlich B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) und die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-18. Dies führt zur Entwicklung einer starken und breit gefächerten T-Helfer1 (Th1)-basierenden zellulären und humoralen Immunantwort.

Zusammengefasst müssen also drei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein, um eine starke Immunantwort auszulösen: Das Vorhandensein mehrerer T-Helfer- und CTL-Epitope in ausreichender Anzahl, die Möglichkeit diese Antigene in den MHC-I und -II Prozessierungs- und Präsentationsweg einzuschleusen und eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems.

#### **A.3.4.2. T-Zell Epitope des Pr55<sup>Gag</sup> Polyproteins**

Innerhalb des Pr55<sup>Gag</sup> Polyproteins wurde eine große Anzahl an T-Zell-Epitopen beschrieben, die von CD4<sup>+</sup> (Rosenberg et al. 1997, Boaz et al. 2003) und CD8<sup>+</sup> Zellen (Harrer et al. 1998, Currier et al. 2002, Goulder et al. 2001) HIV-1-infizierter Personen effektiv erkannt werden. Außerdem wird die besondere Bedeutung des Pr55<sup>Gag</sup> Polyproteins für die Induktion zellulärer Immunantworten noch dadurch unterstrichen, dass es unter den verschiedenen HIV-1 Subtypen relativ konserviert ist und somit eine breite kreuzreaktive CTL-Antwort auslösen kann (Betts et al. 1997, Durali et al. 1998, Lynch et al. 1998). Die Pr55<sup>Gag</sup> VLP beinhalten also T-Zell-Epitope, die in der Lage sind, die gewünschten Immunantworten auszulösen. Darüber hinaus liegen diese Epitope aufgrund der Zusammensetzung der VLP aus tausenden Pr55<sup>Gag</sup> Molekülen in einer so großen Anzahl vor, dass mit der Aufnahme eines einzigen Partikels eine ganze Masse an T-Zell-Epitopen in den Prozessierungs- und Präsentationsweg einer antigenpräsentierenden Zelle eingeschleust wird.

Das Pr55<sup>Gag</sup> Polyprotein kann aber auch aufgrund der Möglichkeit zur Integration von Fremdproteinen als Träger für andere Polypeptide dienen. In bestimmte Regionen können kleine Proteine integriert oder C-terminal fusioniert werden, ohne die partikelbildenden Eigenschaften zu beeinträchtigen (Typ-1 VLP) (Luo et al. 1992, Griffiths et al. 1993, Wagner et al. 1996). Größere Fremdproteine können dagegen über Transmembrandomänen auf der Oberfläche der VLP verankert werden (Typ-2 VLP) (Haffar et al. 1991, Rovinski et al. 1992, Deml et al. 1997, Montefiori et al. 2001, Buonaguro et al. 2002). So können die VLP um fast jedes andere gewünschte T-Zell-Epitop erweitert werden.

#### **A.3.4.3. VLP-vermittelte Pr55<sup>Gag</sup> Epitoppräsentation auf MHC-I und MHC-II Molekülen**

Der Zugang von Polypeptiden zu den MHC-I und -II Prozessierungs- und Präsentationswegen ist eine wichtige Voraussetzung, um zelluläre Immunantworten auszulösen. Von Pr55<sup>Gag</sup> VLP wurde wiederholt berichtet, in vivo starke T-Helfer- und CTL-Antworten zu induzieren. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die exogen dargebotenen VLP effizient von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, in den Prozessierungs- und Präsentationsweg eingeschleust und die Epitope auf MHC-I und -II Molekülen präsentiert werden. Die hierbei zugrunde liegenden

Mechanismen sind bislang noch nicht gänzlich aufgeklärt. Jedoch scheinen mehrere Komponenten der VLP zu der effizienten Aufnahme und dem entsprechenden Abbau der Partikel beizutragen.

Diskutiert wird unter anderem ob die Lipidhülle der Pr55<sup>Gag</sup> VLP eine Rolle spielt, da für Proteine, die mit Lipiden oder Liposomen konjugiert wurden, gezeigt werden konnte, dass sie leichter Zugang zum endogenen Prozessierungsweg erhalten (Lopes et al. 1992, Martinon et al. 1992, Schild et al. 1991). Die Lipidkomponenten könnten also zu der beobachteten Aufnahme und dem Einschleusen dieser Antigene in den MHC-I Prozessierungsweg führen.

Eine Studie von Buseyne et al. zeigt, dass fusogene Proteine, wie die natürlichen HIV Env-Proteine oder das vesikuläre Stomatitisvirus-Oberflächenprotein G (VSV-G) für ein effizientes Einschleusen von HI-Virionen in den MHC-I Weg von primären humanen APC erforderlich sind. Hüllmembranfreie und fusionsinkompetente Viruspartikel waren dagegen nicht zur Stimulation von Effektorzellen geeignet, was darauf hinweist, dass eine nichtspezifische Aufnahme von viralen Partikeln durch Phagozytose und Makropinozytose zu keiner detektierbaren Präsentation viraler Epitope führt (Buseyne et al. 2001).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass hüllmembranfreie Pr55<sup>Gag</sup> VLP, die in Hefezellen produziert wurden, von humanen MDDC (*monocyte derived dendritic cells*) über Mannose-Rezeptoren erkannt, aufgenommen und durch so genannte Kreuzpräsentation über den MHC-I Weg präsentiert wurden (Tsunetsugu-Yokota et al. 2003).

Hingegen scheint die Aufnahme von baculoviralen VLP durch murine APC eher über Membranfusion zu erfolgen als über Endozytose. Diese VLP enthalten baculovirale Hüllproteine, wie das Glykoprotein gp64, die zur Fusion der Partikel mit der Zellmembran von APC führen könnten. Das gp64 Protein stellt die Hauptkomponente der baculoviralen Hülle dar und ist für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle wichtig (Blissard et al. 1992, Monsma et al. 1996).

Die Anwesenheit von fusogenen Proteinen auf der Oberfläche von VLP scheint somit eine wichtige Determinante für die Art der Aufnahme, der Prozessierung und der Epitoppräsentation durch APC zu sein.

#### A.3.4.4. Stimulation des angeborenen Immunsystems durch Pr55<sup>Gag</sup> VLP

Pr55<sup>Gag</sup> VLP aus verschiedenen Expressionssystemen wirken auch als Alarmsignale, die das angeborene Immunsystem aktivieren. Für in Hefezellen hergestellte VLP wurde gezeigt, dass sie die Reifung und Zytokinproduktion von dendritischen Zellen (*dendritic cells* (DC)) induzieren können. Nach Aufnahme dieser VLP über Makropinozytose oder Endozytose erfolgte eine Hochregulierung der Oberflächenmarker CD83 und HLA-DR sowie eine erhöhte Produktion verschiedener Zytokine, vor allem von Interleukin (IL)-12 und Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  (Tsunetsugu-Yokota et al. 2003). In dieser Studie stimulierten Hefezellmembranen die Maturation der DC ebenso effizient wie die Partikel selbst. Dagegen wurde die Zytokinproduktion nur durch VLP angeregt. Die beobachtete Aktivierung der DC durch VLP erfolgte hierbei über den TLR-2 Signalweg. Eine Kombination aus Hefezellmembranen und anderen partikulären Komponenten könnte also auf die DC als Alarmsignal wirken und TLR getriggerte Kaskaden in Gang setzen (Deml et al. 2005).

Auch baculovirale Pr55<sup>Gag</sup> VLP (bvVLP) sind starke Aktivatoren des angeborenen Immunsystems. Buonaguro et al. berichteten über die Maturation und Aktivierung von MDDC durch bvVLP über einen TLR-2 und -4 unabhängigen Weg (Buonaguro et al. 2006). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass bvVLP in der Lage sind PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) zur Produktion eines breiten Spektrums an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen anzuregen, wobei Verunreinigungen durch baculovirale Bestandteile nur wenig Einfluss hatten. Außerdem führte die Stimulation von Monozyten mit diesen VLP zur Hochregulierung von Oberflächenmarkern, die zur Adhäsion, Phagozytose und Antigenpräsentation wichtig sind (Speth et al. 2008).

Es scheinen also sowohl die partikuläre Struktur der VLP als auch Bestandteile der im jeweiligen Expressionssystem verwendeten Zellen bzw. Vektoren zu der beobachteten Aktivierung des angeborenen Immunsystems beizutragen.

#### A.4. Zielsetzung

Nach vielen Jahren der HIV Forschung konnte noch immer kein geeigneter Impfstoff gefunden werden und doch scheint eine schützende Vakzine die einzige Möglichkeit zu sein, die Ausbreitung der AIDS-Pandemie aufzuhalten. Konventionelle

Impfstoffkonzepte zeigten entweder keine ausreichende Wirkung oder konnten aus Sicherheitsgründen nicht eingesetzt werden. Virusähnliche Partikel haben den Vorteil, dass sie zum einen starke Immunantworten auslösen können, zum anderen nicht infektiös und somit sehr sicher sind. Pr55<sup>Gag</sup> VLP führten in Tierexperimenten sowohl zu humoralen als auch zu zellulären Antworten. Außerdem erwiesen sie sich als geeignete Aktivatoren des angeborenen Immunsystems. Jedoch scheinen hierbei auch Verunreinigungen, die bei der Produktion in den verschiedenen Expressionssystemen entstehen, eine Rolle zu spielen.

Ziel dieser Arbeit war es, Pr55<sup>Gag</sup> VLP aus zwei verschiedenen Expressionssystemen, dem baculoviralen und dem Säugerzellsystem, hinsichtlich ihrer Wirkung auf das humane angeborene Immunsystem zu vergleichen. Dazu sollte zunächst ein *ex vivo* Modell humaner dendritischer Zellen für die Durchführung von Maturations- und Aktivierungsstudien etabliert werden. Nach Produktion und biochemischer Untersuchung der verschiedenen Pr55<sup>Gag</sup> VLP sollten Stimulationsversuche, bei denen die Hochregulierung bestimmter Oberflächenmarker und die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine durch die dendritischen Zellen bestimmt werden, durchgeführt werden. Ein weiteres Ziel bestand darin, den Einfluss verunreinigender Bestandteile der VLP-Präparationen zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen für die Aufnahme der Partikel und die Aktivierung der Zellen aufzuklären.



## **B. Material und Methoden**

### **B.1. Material**

#### **B.1.1. Chemikalien**

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim), Enzyme, wenn nicht anders angegeben, von Roche (Mannheim) oder von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

#### **B.1.2. Eukaryontische Zelllinien**

Die 293T-Zellen (humane Nierenkarzinomzellen) stammen aus dem Bestand unserer Arbeitsgruppe und wurden ausschließlich für die transiente Expression der verschiedenen VLP (*virus like particles*) verwendet.

Die Zelllinie High Five<sup>TM</sup>, die aus den Beständen des Instituts stammt, wurde ursprünglich aus Homogenisaten von *Trichoplusia ni* Eizellen gewonnen und dient der Überexpression von Fremdgenen durch rekombinante Baculoviren.

#### **B.1.3. Nährmedien für eukaryontische Zellen**

Als Standardmedium für adhärente, eukaryontische Zellen wurde *Dullbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco/BRL GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen) mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

Die Kultivierung der High Five<sup>TM</sup> Zellen erfolgte mit InsectExpress Medium (BioWhittaker, Walkersville) mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Alle für die Zellkultur verwendeten Chemikalien, Zellkulturmedien und Antibiotika waren speziell für die Zellkultur getestet und wurden von PAN biotech (Aidenbach), BD (Heidelberg) oder SIGMA (Deisenhofen) bezogen. Das fötale Kälberserum (FKS) (PAN biotech, Aidenbach) wurde bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert.

#### **B.1.4. Plasmidvektoren**

pcDNA3.1/III<sub>B</sub>syngag: Die an humanes *codon usage* adaptierte Version des Gruppenspezifischen Antigens des HI-Virus III<sub>B</sub> wurde in unserer Arbeitsgruppe im

Jahr 2000 hergestellt (Graf et al. 2000). Das auf das humane Genom optimierte Transgen wurde über KpnI und XhoI Restriktionsschnittstellen in die *multiple cloning site* (MCS) des kommerziellen pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen, Groningen, NL) subkloniert.

pcsyngagOVA\_gp64: Dieses Plasmid basiert auf dem pcDNA3.1/III Bsyngag Vektor, an dessen gag-Gen N-terminal eine 60 Nucleotid lange Ovalbumin (OVA)-Sequenz fusioniert wurde. Zusätzlich enthält das Plasmid die kodierende Sequenz für das baculovirale Hüllprotein gp64 unter dem SV40 Promotor.

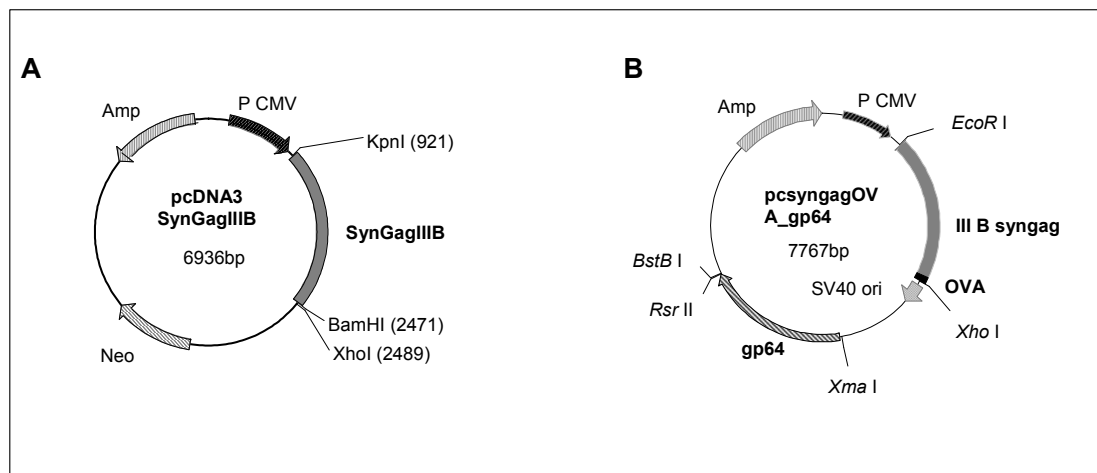


Abb. B.1: Plasmidvektoren

- (A) pcDNA3.1/III Bsyngag (6936 bp): Dieses Plasmid enthält das auf das humane Genom optimierte Transgen syngagIII B unter der Kontrolle des CMV-Promotors.
- (B) pcsyngagOVA\_gp64 (7767 bp): Dieses Plasmid enthält unter der Kontrolle des CMV-Promotors das syngagIII B-Gen, an dessen N-terminales Ende eine Ovalbumin-Sequenz fusioniert wurde und das gp64-Gen unter Kontrolle des SV40-Promotors.

Abkürzungen: Amp: Ampicillin Resistenzgen; P CMV: CMV-Promotor; SV40ori: SV40-Promotor.

### B.1.5. Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (*Primer*) zur PCR-Analyse verwendet. Die Oligonukleotide wurden in lyophilisiertem Zustand und entsalztem Reinheitsgrad von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

gp64-KOZAK-forward:

5'-GG**GAGCT-CG**-CTAGCGCCGCCACCATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAA-3'

**Sac I**      **Nhe I**      Kozak

gp64 reverse:

5'-GG**GGTAC-CG**-AATTCTTAATATTGTCTATTACGGT-3'

**Kpn I**      **EcoR I**

#### B.1.6. DNA-/ Protein- Molekulargewichtsstandards

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Molekulargewichtsstandards *Expand DNA molecular weight marker* (Roche, Mannheim; Nr. XV) und *1 kb DNA Ladder* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) verwendet. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurde Precision Plus Protein<sup>TM</sup> (BIO-RAD, München) eingesetzt.

#### B.1.7. Virusstämme

Das Wildtyp Baculovirus (*Autographa californica mononuclear polyhedrosis Virus* (AcMNPV)) (Smith et al. 1985) sowie das rekombinante Baculovirus zur Expression des HIV Pr55<sup>gag</sup> Gens (Ac-Pr55) stammen aus der Arbeitsgruppe.

#### B.1.8. Buffy Coat

Als *Buffy Coat* bezeichnet man die Fraktion abzentrifugierten Blutes, welche die meisten Leukozyten und Thrombozyten enthält. Die in dieser Arbeit verwendeten *Buffy Coats* stammten aus Eigenblutspenden und wurden mir vom Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg zur Verfügung gestellt. Alle Blutspender wurden über die Verwendung ihrer Leukozyten zu Forschungszwecken aufgeklärt.

## **B.2. Methoden**

### **B.2.1. Zellkulturtechniken**

#### **B.2.1.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen**

High Five™ Zellen wurden als Monolayerkultur in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aus Polystyrol (Falcon) bei 27°C im Brutschrank (Haereus, Hanau) kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:5 gesplittet. Die Zellen konnten hierbei durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst und vereinzelt werden.

Die adhärente humane Zelllinie 293T wurde ebenfalls in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Falcon) in einem Brutschrank (Haereus, Hanau) bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage mittels einer 0,25%-igen Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) vom Flaschenboden abgespült und anschließend 1:20 gesplittet.

#### **B.2.1.2. Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Lebendzellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde eine gründlich resuspendierte Zellkultur mit einer 0,5%-igen Trypanblau-Lösung (Merck, Darmstadt) im Verhältnis 1:1 oder 1:9 verdünnt. Da der Farbstoff nur bei toten Zellen die Zellmembran durchdringen kann, können lebende transparente Zellen von den blau gefärbten toten Zellen unterschieden werden.

### **B.2.2. Herstellung und Aufbereitung von Pr55<sup>gag</sup> VLP in unterschiedlichen Expressionssystemen**

#### **B.2.2.1. Produktion von Pr55<sup>gag</sup> VLP im Säuger-Expressionssystem**

Zur Produktion von VLP im Säuger-Expressionssystem wurden 293T Zellen mittels der CaHPO<sub>4</sub><sup>-</sup>-Präzipitations-Methode transient transfiziert.

Hierzu wurden am Vortag der Transfektion 4 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Petrischale (Ø 10 cm) in einem Volumen von 15 ml ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Für die Transfektion der Zellen wurden 21 µg Plasmid-DNA mit 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> (sterilfiltriert) in einem Gesamtvolumen von 500 µl mit sterilen Wasser vereint und unter Vortexen tropfenweise zu 500 µl des 2x HeBS (HEPES *buffered saline*)-Puffers

(8,2 g NaCl, 5,95 g HEPES, 0,105 NaHPO<sub>4</sub> in 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, pH 7,05) pipettiert. Während des 20-minütigen Inkubationsschrittes bei Raumtemperatur bildet sich das Präzipitat aus, das auf die zu transfizierenden 293T-Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden dann für 12 bis maximal 16 Stunden und, nach vorsichtigem Waschen mit warmen PBS und anschließender Zugabe von frischem Kultivierungsmedium, für insgesamt 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellüberstände geerntet und mittels Zentrifugation bei geringer Drehzahl (300g) von Zellen und größeren Zellbestandteilen abgetrennt.

#### **B.2.2.2. Produktion von Pr55<sup>gag</sup> VLP im baculoviralen Expressionssystem**

Zur Produktion von VLP mittels des Baculovirus-Expressionssystems wurden High Five™ Zellen mit dem Gag-rekombinanten Baculovirus Ac-Pr55 infiziert. Zunächst wurden pro 75 cm<sup>2</sup> Serumflasche 8 x 10<sup>6</sup> High Five™ Zellen in einem Volumen von 10 ml Kultivierungsmedium ausgesät und 30 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die Zellen an den Flaschenboden adhärieren konnten. Anschließend wurde das Medium abgenommen, 3,5 ml Infektionsmedium (3 ml Kultivierungsmedium und 0,5 ml Virusstock) zugegeben und vorsichtig geschwenkt, um den Flaschenboden gleichmäßig zu benetzen. Nach etwa 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden nochmals 8,5 ml Kultivierungsmedium zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, die Zellen nicht vom Boden abzulösen. Schließlich wurden die infizierten Zellen für 72 Stunden bei 27°C im Brutschrank inkubiert, danach die Zellüberstände geerntet und mittels Zentrifugation bei geringer Drehzahl (300g) von Zellen und größeren Zellbestandteilen abgetrennt.

#### **B.2.2.3. Aufbereitung der Pr55<sup>gag</sup> VLP**

Zur Aufkonzentrierung von Pr55<sup>gag</sup> Partikeln aus den verschiedenen Expressionssystemen wurden die vorzentrifugierten Zellkulturüberstände über ein Saccharosekissen in einer Ultrazentrifuge (Opt L 90 K, Beckman Coulter, Krefeld) abzentrifugiert. Dazu wurden 32 ml der Zellkulturüberstände in Ultrazentrifugen-Röhrchen (25 x 89 mm, Beckman Coulter, Krefeld) überführt und mit 5 ml 4°C kalter 30%-iger Saccharoselösung (16,59 g Saccharose in 50 ml Millipore Wasser) unterschichtet. Danach erfolgte die Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge mit dem SW32 Rotor (SW32 Ti, Beckman Coulter, Krefeld) für 2,5 Stunden bei 25.000 rpm

und 16°C. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, die Röhrchen umgedreht bei Raumtemperatur ca. 5 Minuten stehen gelassen und der Röhrchenhals innen mit einem fusselfreien Tuch leicht abgewischt. Das so erhaltene Pellet wurde in PBS (*phosphate-buffered saline* ohne bivalente Ionen (80 g NaCl, 2 g KCl, 14,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O, 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0 bis 7,7)) resuspendiert und über Nacht bei 4°C zum Aufquellen aufbewahrt. Ein Aliquot jeder Präparation wurde mittels eines Bradford Tests, einer Westernblot-Analyse und einer Coomassie Brilliant Blau Färbung charakterisiert.

Außerdem wurden die aufkonzentrierten Pr55<sup>gag</sup> Partikel zur weiteren Analyse auf einen Saccharose-Dichtegradienten (10 bis 50%-ige Saccharoselösung, in 10% Schritten) aufgetragen und in einer Ultrazentrifuge (SW41 Rotor, Beckman) für 2,5 Stunden bei 28.000 rpm und 16°C zentrifugiert. Anschließend wurden von oben beginnend 20 bis 21 Fraktionen vorsichtig abgenommen und mittels Westernblot analysiert.

Die so gewonnenen Pr55<sup>gag</sup> VLP aus dem Säuger-System mit 293T Zellen werden als Säuger-VLP (*mammalian* VLP, mVLP), die aus dem baculoviralen System als baculovirale VLP (bvVLP) bezeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendeten mVLP wurden von Melanie Wiesel, die bvVLP von Simon Bredl zur Verfügung gestellt.

### **B.2.3. Analyse der Pr55<sup>gag</sup> VLP**

#### **B.2.3.1. Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Immunoblotanalyse der exprimierten Proteine aus den Zellüberständen wurde zunächst deren Gesamtproteinmenge pro Ansatz quantitativ mit dem *Bradford-Protein-Assay* nach Angaben des Herstellers (BIORAD, München) bestimmt. Das Reagenz dieses Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteine einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionszunahme bei 595 nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen optischen Dichte (OD) mit den Werten einer BSA-Eichkurve lässt sich die Proteinmenge näherungsweise bestimmen.

### **B.2.3.2. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Bei der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladung so, dass alle Proteine etwa ihrer Größe entsprechend negativ geladen sind und bei Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Dabei werden nach Laemmli (Laemmli, 1970) die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Fling und Gregerson, 1986) zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel konzentriert, von welchem dann alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel übergehen.

Der Aufbau der verwendeten Gelapparaturen und das Gießen der Gele ist der Beschreibung der Gerätehersteller (BIOMETRA, Göttingen) zu entnehmen, die genaue Zusammensetzung der Gellösungen ist in der nachfolgenden Tabelle (Tab. B.1) beschrieben. Für die Proteinanalyse aus den Überständen wurden 5 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5 µl 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (125 mM Tris pH 6,8, 2% 2-β-Mercaptoethanol, 10% Glyzerin, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau) versetzt. Für die Westernblotanalyse der einzelnen Fraktionen eines Saccharosegradienten wurden zu jeweils 10 µl einer Fraktion, ohne deren Proteingehalt weiter zu bestimmen, 30 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 5-fach SDS-Probenpuffer gegeben. Nachdem dann die Proben für 10 Minuten bei 92°C aufgeköcht und kurz abzentrifugiert worden waren, wurden sie auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen SDS-PAGE Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,5, 190 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 20 bis 60 mA.

Zur Analyse der Saccharosegradienten wurden große Gele verwendet, die mit dem jeweils doppelten Volumen der oben aufgeführten Komponenten hergestellt wurden.

Bestandteile	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
30% Acrylamid- 0,8% Bisacrylamid-Stammlösung	7,5 ml	0,99 ml
1,88 M Tris/HCl pH 8,8	3,6 ml	-
0,625 M Tris/HCl pH 6,8	-	1,2 ml
0,5% SDS-Lösung	3,6 ml	1,2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	3,3 ml	2,61 ml
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	15 µl	6 µl
10% Ammoniumpersulfat (APS)	90 µl	30 µl

Tab. B.1: Zusammensetzung der Gellösungen

### B.2.3.3. Färbung mit Coomassie Brilliant Blau

Für die Anfärbung der aufgetrennten Proteine wurden die Proteingele nach der SDS-Gelelektrophorese mindestens fünf Stunden lang bei Raumtemperatur in einer Färbelösung (45% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,25% Coomassie Brilliant Blau R250) inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Gele in einer Entfärbelösung (7% Essigsäure) solange leicht geschüttelt, bis die Proteinbanden klar erkennbar waren. Zur Konservierung wurden die Gele anschließend auf Whatman 3 mm – Papier im Vakuum bei 65°C für zwei Stunden getrocknet.

### B.2.3.4. Westernblotanalyse

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf eine 0,45 µm Nitrozellulosemembran erfolgte in einer Fast-Blot *semidry*-Apparatur (BIOMETRA, Göttingen) unter Verwendung eines leitfähigen BIORAD-Transferpuffers (150 mM Glycin, 25 mM Tris pH 8,3, 10% Methanol) für 45 Minuten bei einer maximalen Stromstärke von 0,6 A. Die Proteine wandern nach Anlegen der Spannung entsprechend ihrer durch die SDS-Behandlung bedingten negativen Ladung in Richtung Anode und werden auf der Nitrozellulose immobilisiert. Der erfolgte Proteintransfer wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung (0,2 g Ponceau S, 3 g Trichloressigsäure, 3 g Sulfosalicylsäure, in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>) überprüft. Dabei wurden die Positionen der Proteine des Molekular-



gewichtsstandards mit Kugelschreiber angezeichnet. Anschließend wurde die Färbung mit Wasser oder TTBS (500 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder ausgewaschen. Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran beruht auf der Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das Enzym alkalische Phosphatase (AP), das an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, führt zu einer Anfärbung, welche dann die Position des gesuchten Proteins auf der Membran anzeigt. Um freie und unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde diese nach dem Blotten über Nacht bei Raumtemperatur in einer 5%-igen Magermilch-TBS (*tris buffered saline*: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5)-Lösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit TTBS (*tween-tris buffered saline*: 150mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0,02 M Tween 20, pH 7,5)-Lösung gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran wie zuvor gewaschen, der sekundäre AP-gekoppelte Antikörper zugegeben und wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde dann durch abschließendes Waschen entfernt. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von AP-Färbelösung (400 µl NBT/BCIP-Stocklösung in 20 ml AP-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris) gestartet und nach dem Erreichen der gewünschten Intensität der Färbung durch Spülen der Membran mit Wasser gestoppt. Die eingesetzten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen sind in folgender Tabelle (Tab. B.2) aufgeführt.

Antikörper	13/5	$\alpha$ -gp64 (AcV5)	AP- $\alpha$ -Maus
Spezifität	HIV-1 Pr55 <sup>Gag</sup> (Erkennungsregion: Aminosäure 133 bis 158; (Wolf et al., 1990))	Hüllprotein gp64 des Baculovirus AcMNPV	Murine Immunglobuline
Herkunft	Maus	Maus	Ziege
Besonderheiten	-	-	Gekoppelt mit alkalischer Phosphatase (AP)
Firma	-	eBioscience	BIORAD
Verdünnung	1:500	1:500	1:2000

Tab. B.2: Antikörper für Westernblotanalyse

#### B.2.4. Labelling der Pr55<sup>Gag</sup> VLP

Um die VLP aus den verschiedenen Expressionssystemen mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren, wurden je 100  $\mu$ g VLP oder 100  $\mu$ g BSA (bovines Serumalbumin) als Kontrolle in 150  $\mu$ l PBS mit 37,5  $\mu$ l CFDA SE (100  $\mu$ M) (Vybrant<sup>®</sup> CFDA SE Cell Tracer Kit, Molecular Probes, Eugene, OR), was einer Endkonzentration von 20  $\mu$ M CFDA SE entspricht, für eine Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. CFDA SE (*carboxyfluorescein diacetate, succinimidylester*) (Abb. B.2) ist farblos und diffundiert passiv in Zellen, wo seine Acetatreste von intrazellulären Esterasen abgespaltet werden. Der daraus resultierende Carboxyfluorescein Succinimidylester fluoresziert mit einem Anregungs-/Emissionsmaximum von 492/517nm. Außerdem reagiert CFDA SE unspezifisch mit Aminogruppen.

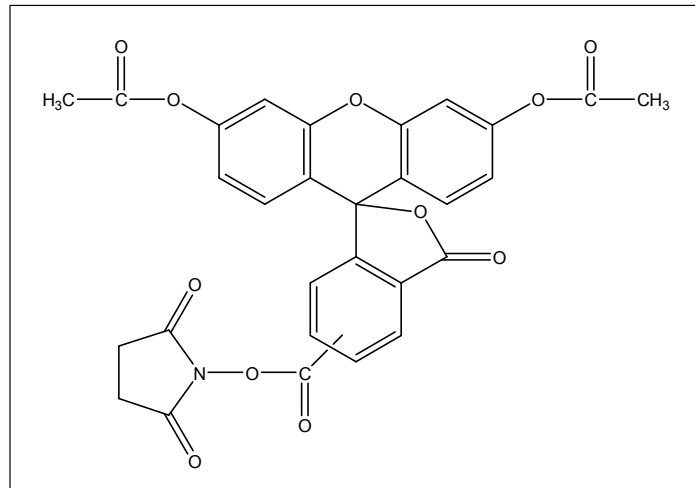


Abb. B.2: Struktur von Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFDA SE)

Die Farbstoff-gekoppelten VLP wurden anschließend in 15 ml Falcons überführt, mit PBS auf 9 ml aufgefüllt und gut vermischt. Als Negativkontrolle wurden 37,5 µl CFDA (100 µM) ebenfalls in ein 15 ml Falcon überführt und mit PBS auf 9 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die VLP-Suspensionen in Ultrazentrifugen-Röhrchen (14 x 95 mm, Beckman Coulter, Krefeld) überführt, mit 2 ml 4°C kalter 30%-iger Saccharose-lösung unterschichtet und in einer Ultrazentrifuge (Opt L 90 K, Rotor: SW40 Ti, Beckman Coulter) eine Stunde lang bei 25°C und 23500 rpm zentrifugiert, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, die Röhrchen ca. 5 Minuten umgedreht bei Raumtemperatur stehen gelassen und der Röhrchenhals mit einem fusselfreien Tuch sorgfältig abgetupft. Das erhaltene Pellet wurde in 187,5 µl PBS aufgenommen und bei 4°C aufbewahrt (maximal für 15 Stunden).

### B.2.5. Baculovirus Titerbestimmung mittels FACS

Um den Titer an Baculoviren im Virusstock und in der bvVLP-Stocklösung zu bestimmen, wurde ein Verfahren gewählt, bei dem Baculovirustiter mittels FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) (siehe B.2.10.4.) analysiert werden (Mulvania et al. 2004).

HighFive™ Insektenzellen wurden mit Medium (Insect-Xpress, BioWhittaker; 1% P/S) auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und auf einer 96-Well-Platte ausgesät (100 µl/Well). Während des nachfolgenden 30-minütigen Inkubations-schrittes konnten die Zellen adhären.

In der Zwischenzeit wurden folgende Verdünnungsstufen des Virusstocks bzw. der bvVLP-Stocklösung hergestellt: unverdünnt, 1:5, 1:50, 1:500 und 1:5000. Nach Zugabe von je 100 µl dieser Verdünnungen zu den Zellen (jeweils doppelter Ansatz) ergaben sich die Endverdünnungen 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000. Nachdem die 96-Well-Platte für 18 Stunden bei 27°C auf einem Schüttler inkubiert worden war, folgte die Abnahme der Zellen und 2-maliges Waschen der Proben mit kaltem PBS. Schließlich wurde der Anti-gp64-Antikörper (AcV1 (mouse IgG2a); eBioscience, San Diego) zugegeben (1:250 in PBS mit 0,05% BSA (bovines Serumalbumin)) und der Ansatz 15 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe des sekundären Anti-Maus-PE-gekoppelten Antikörpers (*Anti Mouse Immunglobulin/RPE (Rabbit F(ab')<sub>2</sub>*); Dako, Hamburg) (1:250 in PBS mit 0,05% BSA) und eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C und lichtgeschützt. Danach wurden die Zellen wieder zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in 200 µl PBS mit 0,05% BSA aufgenommen und am FACS-Gerät (Beckman Coulter; Epics XL.MCL) analysiert.

Der Titer lässt sich dann folgendermaßen berechnen:

Man geht davon aus, dass die Stocklösung in der Lage ist alle Zellen zu infizieren, d.h. 100% der Zellen müssten gp64 auf ihrer Oberfläche exprimieren und demnach ein Fluoreszenzsignal abgeben. Da sich aber auch Zellen im Ansatz befinden, die aus verschiedenen Gründen (z.B. tote Zellen) nicht infiziert werden können, wird die Anzahl an tatsächlich infizierten Zellen als Maximum, also 100%, gewertet. Um die Daten aus den Verdünnungen zu kompensieren, werden die Werte durch den Anteil der positiven Zellen der Stocklösung dividiert (Korrektur) und anschließend mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Schließlich wird aus den korrigierten Werten der Verdünnungen der Mittelwert berechnet und mit der Anzahl der Zellen pro Well multipliziert.

## Titerberechnung (Rechenbeispiel):

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Verdün- nung	Well 1	Well 2	MW	Korrek- tur	Faktor	Korr. x Faktor	Mittel x Zellzahl
2	Stock	77,5	78,2	77,85				
3	1:10	72,9	72,4	72,65	0,93320	10	9,332	
4	1:100	49,1	44,7	46,9	0,60244	100	60,24	
5	1:1000	10,9	9,5	10,2	0,13102	1000	131,02	
6	1:10000	1,8	1,4	1,6	0,02055	10000	205,5	
7	Mittel						101,523	
8	<b>Titer</b>							<b>2,03 x 10<sup>8</sup></b>

**Faktor:** Verdünnungsfaktor; **Korr.:** Korrektur; **Zellzahl:** 2 x 10<sup>6</sup>; **MW:** Mittelwert

Formel:

$$\text{Titer} = \frac{\frac{B3 + C3}{2} \times F3 + \frac{B4 + C4}{2} \times F4 + \frac{B5 + C5}{2} \times F5 + \frac{B6 + C6}{2} \times F6}{\frac{B2 + C2}{2}} : 4 \times \text{Zellzahl/Well}$$

## B.2.6. Isolierung und Verarbeitung baculoviraler DNA

### B.2.6.1. Isolierung von DNA aus Wildtyp-Baculoviren

Um genügend Baculoviren für die DNA-Isolierung zu gewinnen, wurden ca. 100 Serumflaschen (75 cm<sup>2</sup>) High Five™ Zellen mit Wildtyp Baculovirus AcMNPV infiziert. Zunächst wurden pro 75 cm<sup>2</sup> Serumflasche 8 x 10<sup>6</sup> High Five™ Zellen in einem Volumen von 10 ml Kultivierungsmedium ausgesät und 30 bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass die Zellen an den Flaschenboden adhäreren konnten. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgenommen, 3,5 ml Infektionsmedium (3 ml Kultivierungsmedium und 0,5 ml Virusstock) zugegeben und vorsichtig geschwenkt, um den Flaschenboden gleichmäßig zu benetzen. Nach etwa 45 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden vorsichtig, um die Zellen nicht abzulösen, nochmals 8,5 ml Kultivierungsmedium zugegeben. Schließlich wurden die infizierten Zellen für 72 Stunden bei 27°C im Brutschrank inkubiert und danach die Zellüberstände geerntet und mittels Zentrifugation bei geringer Drehzahl von Zellen und größeren Zellbestandteilen abgetrennt. Anschließend wurden die Viren wie in B.2.2.3. beschrieben durch Zentrifugation über ein 30%-iges Saccharosekissen in einer Ultrazentrifuge (Opt L 90 K, Beckman Coulter, Krefeld) mit dem SW32 Rotor

(SW32 Ti, Beckman Coulter, Krefeld) für 2,5 Stunden bei 25.000 rpm und 16°C aufkonzentriert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgekippt, die Röhrchen umgedreht bei Raumtemperatur ca. 5 Minuten stehen gelassen und der Röhrchenhals mit einem fusselfreien Tuch innen leicht abgewischt. Das so erhaltene Pellet wurde in 100 µl Puffer G2 (QIAGEN, Hilden) (siehe Tab. B.3) aufgenommen und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Für die Isolierung von baculoviraler DNA aus der Virussuspension wurde der Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Hierzu wurden zunächst die Virussuspensionen vom Vortag vereinigt und je 0,5 ml davon nach dem zum Kit gehörenden „Tissue“-Protokoll mit einem Gemisch aus 2 ml Puffer G2, 4 µl RNase A (100 mg/ml; QIAGEN, Hilden) und 100 µl QIAGEN Protease (QIAGEN, Hilden) im Wasserbad bei 50°C für 2 Stunden inkubiert, um die Virushülle und andere virale Proteine zu denaturieren und zu verdauen. Die so freigelegte DNA wurde anschließend über die im Kit enthaltenen Anionen-Austauscher-Harz Säulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Dabei bindet die DNA durch Interaktion der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA mit den positiv geladenen DEAE (Diethylamino Ethanol)-Gruppen des Harzes an die Säule. RNA, Proteine und andere Verunreinigungen können mit Puffern mit niedriger bis mittlerer Salzkonzentration aus dem Harz gewaschen werden, wohingegen die DNA erst unter Hochsalzbedingungen eluiert wird. Nachdem die DNA in einem 15 ml Falcon Tube mit 1,4 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt und abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 15 min, 4°C, 3220 x g) worden war, folgte ein Waschschrift mit 1 ml eiskaltem Ethanol (70%). Schließlich wurde die DNA nochmals zentrifugiert (10 min, 4°C, 3220 x g), und das Pellet nach 5 Minuten Trockenzeit bei Raumtemperatur in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Präparationen konnten über Nacht bei 4°C aufquellen und wurden danach vereinigt.

<b>Puffer</b>		<b>Zusammensetzung</b>
Puffer (Verdauungspuffer)	G2	800 mM Guanidin HCl; 30 mM Tris-Cl, pH 8,0; 30 mM EDTA, pH 8,0; 5% Tween-20; 0,5% Triton X-100
Puffer (Äquilibrierungspuffer)	QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol, 0,15% Triton X-100
Puffer (Waschpuffer)	QC	1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol
Puffer (Elutionspuffer)	QF	1,25 M NaCl ; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5 ; 15% Isopropanol
TE		10 mM Tris-Cl, pH 8,0 ; 1 mM EDTA, pH 8,0

Tab. B.3 : Zusammensetzung der Puffer des Blood &amp; Cell Culture DNA Mini Kit

#### B.2.6.2. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde mithilfe eines Spektralphotometers (Uvikon 930, Kontron) über den Wellenbereich von 230-320 nm ermittelt. Aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm ( $OD_{258}$ ) konnte die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden ( $1 OD_{258} = 47,5 \mu\text{g dsDNA/ml}$ ).

#### B.2.6.3. Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen oder Nuklease

Um die isolierte DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese zu analysieren wurde sie zuerst mit den Restriktionsenzymen Xma I und Rsr II (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) eine Stunde lang bei 37°C verdaut.

## Ansatz des Restriktionsenzym-Verdau:

isolierte DNA	8 µl
Xma I (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)	1 µl
Rsr II (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)	1 µl
BSA (10x)	2 µl
NEBuffer 4 (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main)	2 µl
H <sub>2</sub> O	6 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Für einen der Stimulationsversuche wurde die DNA mit der Endonuklease OmniCleave™ (EPICENTRE, Madison, Wisconsin) verdaut um alle CpG-Motive zu zerstören. Dazu wurden 8 µl DNA (0,25 µg/µl) mit 1 µl OmniCleave™ (1 U/µl) und 1 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Inaktivieren der Endonuklease wurden 1,2 µl sterilfiltriertes NaOH (0,2 N) zugegeben, gut vermischt und für 15 Minuten bei 70°C im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nachdem der Ansatz abgekühlt war, wurde er sofort für den entsprechenden Versuch eingesetzt. Als eine Negativkontrolle wurden 8 µl Wasser statt DNA auf die gleiche Weise behandelt.

**B.2.6.4. PCR (polymerase chain reaction)**

Die PCR ist ein Verfahren zur exponentiellen *in vitro* Vermehrung (Amplifikation) definierter Nukleotidsequenzen (Saiki et al. 1988). Der Vorteil dieser Methode besteht in der gezielten 10<sup>2</sup>- bis 10<sup>7</sup>-fachen Amplifikation eines DNA-Fragments. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg).

Die Taq-DNA-Polymerase, isoliert aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, ist eine DNA-abhängige-DNA-Polymerase mit hoher Prozessivität, die aber keine Exonucleaseaktivität und somit keine Korrekturleseaktivität besitzt.



Ein Standardansatz in einem Volumen von 30 µl enthält folgende Komponenten:

isolierte DNA	0,5 µl
Mastermix (2x; Promega GmbH, Mannheim)	15 µl
gp64 forward (10 µM)	1 µl
gp64 reverse (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	12,5 µl
Gesamtvolumen:	30 µl

Folgendes Programm wurde für die Inkubation verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	93°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	40
annealing	55°C	45 s	
Elongation	72°C	1 min	
End-Elongation	72°C	7 min	1
Dauerkühlung	4°C	∞	

Zur Bestimmung des Molekulargewichts des entstandenen PCR-Produkts wurden dem Ansatz 5 µl entnommen und zur Analyse auf ein 1% Agarosegel aufgetragen.

#### B.2.6.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse des PCR-Produktes erfolgte in einem Agarosegel bei konstanter Spannung von 90 V. Für das Gel wurde 1% Agarose in TBE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM Borsäure, 2 mM EDTA) mittels Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst, und anschließend wurde Ethidiumbromid, ein DNA-interkalierendes Agens, in einer Endkonzentration von 50 ng/ml zugegeben. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Saccharose) versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit dem DNA-Molekulargewichtsstandard 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main) aufgetragen. Die Detektion der DNA erfolgte mithilfe eines UV-Durchlichtschirms (Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm, dem Absorptionsmaximum des Ethidiumbromids.

Für die Analyse der DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau wurde ein 0,8%-iges Agarosegel verwendet. Dazu wurden 1,6 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 20 mM NaAc, 2 mM EDTA, pH=8,0) gelöst. Die DNA-Fragmente sowie die DNA-Molekulargewichts-Standards Expand DNA molecular weight marker (Roche, Mannheim; Nr. XV) bzw. 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Frankfurt am Main) wurden wie oben beschrieben aufgetragen und über Nacht bei einer Spannung von 36 V mit konstanter Stromstärke aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt und die DNA wie oben beschrieben detektiert.

### **B.2.7. Limulus Amebocyte Lysate - Test**

Um eine unspezifische Immunaktivierung durch kontaminierende bakterielle Endotoxine auszuschließen, wurden die aufgereinigten VLP, Wildtyp-Baculoviren und die baculovirale DNA mittels des *Limulus Amebocyte Lysate* – Tests auf ihren Endotoxingehalt hin untersucht. Dazu wurden zuerst aus der Endotoxinlösung mit einer definierten Konzentration Verdünnungen für eine Standardreihe hergestellt. Die Versuchsdurchführung erfolgte dann gemäß den Angaben des Herstellers. Jede Probe wurde bei 405 nm photometrisch (Biorad, Microplate Reader 680) vermessen. Aus den Standardwerten wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer man die Werte der einzelnen Proben bestimmen konnte.

### **B.2.8. Isolierung und Aufreinigung von Primärzellen**

#### **B.2.8.1. Isolierung von PBMC (peripheral blood mononuclear cells) aus Buffy Coat**

Zur Isolierung der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*), einer Mischung der mononukleären Blutzellen (Monozyten, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen), aus Blutkonserven (*buffy coat*) wurden je 12,5 ml des Blutes in ein Falcon Tube überführt, mit P2 (PBS mit 2% FKS (fötales Kälberserum, PANbiotech, Aidenbach)) auf 35 ml aufgefüllt und durch leichtes Schwenken vermischt. Parallel dazu wurden 15 ml Ficoll (PANbiotech, Aidenbach) in PBMC Separation-Falcon Tubes gegeben und 1 Minute bei Raumtemperatur und 300 x g abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Ficollschicht im Separation Tube mit 35 ml des verdünnten Blutes

überschichtet. Das direkte Vermischen des Blutes mit Ficoll wurde durch eine sich im Tube befindende permeable Trennscheibe verhindert. Aufgrund der Dichteunterschiede zwischen den PBMC und den restlichen Blutbestandteilen lassen sich diese durch Abzentrifugieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit  $1000 \times g$  ohne Bremse in einzelne Schichten trennen.

Nach dem Abzentrifugieren befinden sich unterhalb der Trennscheibe ein Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten und darüber ein Teil des Separationsmediums. Oberhalb der Trennscheibe befinden sich nach der Zentrifugation das restliche Separationsmedium und das Plasma. Dazwischen bildet sich eine Schicht, die so genannte Interphase, aus, welche die gewünschten PBMC enthält. Diese Schicht wurde nach Abnahme des Serums in ein neues Falcon überführt. Die abgesaugten PBMC wurden mit P2 auf 40 ml aufgefüllt, mit diesem vermischt und für 10 Minuten bei  $5^{\circ}\text{C}$  und  $300 \times g$  zentrifugiert. Am Boden des Tubes entsteht ein Pellet aus PBMC und ein dünner Ring aus Thrombozyten. Um eine Verunreinigung durch Thrombozyten zu minimieren, wurden diese zusammen mit dem Überstand abgesaugt. Das Pellet bestehend aus PBMC wurde in 1 ml P2 resuspendiert, auf 40 ml aufgefüllt und erneut für 10 Minuten bei  $5^{\circ}\text{C}$  und  $300 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Pellet in 1 ml DC-Medium (RPMI 1640 (PANbiotech, Aidenbach) mit 10% FKS, 1% Vitamine (100x, PANbiotech, Aidenbach), 1% L-Glutamin (200mM, Biochrom, Berlin), 1% MEM (*non-essential Amino Acids*, Gibco), 1% Pyruvat, 0,1%  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ , Gibco) und 0,4% PenStrep (40 IU/ml Penicillin, 40  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin, Gibco)) gelöst und die Anzahl der gewonnenen PBMC mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### **B.2.8.2. Isolierung von Monozyten (CD14<sup>+</sup>-Zellen) aus PBMC**

Die Isolierung von Monozyten aus PBMC erfolgte mittels positiver Selektion. Hierzu wurden für die magnetische Separation (*Magnetic Cell Separation*, MACS) CD14 *Micro Beads* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) verwendet, die spezifisch an die CD14<sup>+</sup> Zellen (Monozyten) binden. Je  $1 \times 10^8$  PBMC wurden in ein Falcon Tube überführt und für 10 Minuten bei  $5^{\circ}\text{C}$  und  $300 \times g$  abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 800  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer (PBS mit 0,5% BSA (bovine serum albumin) und 2 mM EDTA) gelöst. Schließlich wurde die Zellsuspension mit 200  $\mu\text{l}$  der CD14 *Micro Beads* für 15 Minuten bei  $5^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde das Tube mit dem 10-fachen Volumen an MACS-Puffer aufgefüllt und für 10 Minuten wiederum bei 5°C und 300 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer gelöst.

Die Säulen (MS Säulen, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für die Separation wurden in den Magneten (MiniMACS Magnet, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) eingesetzt und mit 500 µl MACS-Puffer äquilibriert. Nach vollständigem Durchlaufen des Puffers wurde die gut vermischte Zellsuspension, die nur noch aus Einzelzellen bestehen sollte, auf die Säule gegeben. Im Anschluss daran wurde die Säule 3-mal mit 500 µl MACS-Puffer gespült, um alle nicht gebundenen Zellen zu entfernen. Um die CD14<sup>+</sup> Zellen gekoppelt an *Micro Beads* zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und 1 ml MACS-Puffer unter Verwendung eines Stempels durch die Säule gedrückt.

Die Zellsuspension wurde dann 10 Minuten bei 5°C und 300 x *g* zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 1 ml DC-Medium resuspendiert. Die erhaltenen Zellen wurden ausgezählt und mit DC-Medium auf 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt.

#### **B.2.8.3. Generierung von MDDC (monocyte derived dendritic cells) aus Monozyten (CD14<sup>+</sup>-Zellen)**

Die Kultivierung der Monozyten zu immaturren MDDC (*monocyte derived dendritic cells*) erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml DC-Medium unter der Zugabe der Zytokine Interleukin-4 (Strathmann, Hamburg) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) (Strathmann, Hamburg), jeweils in einer Konzentration von 500 U/ml, für 5 Tage. Um abgebaute Zytokine zu ersetzen, werden diese nach 3 Tagen wie am Tag 0 zugegeben.

#### **B.2.8.4. Isolierung von pDC (plasmacytoid dendritic cells) aus PBMC**

Die Isolierung von pDC aus PBMCs erfolgte ebenfalls mittels positiver Selektion unter Verwendung von BDCA-4 Micro Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Je 2 x 10<sup>8</sup> PBMCs wurden in ein Falcon Tube überführt und für 10 Minuten bei 5°C und 300 x *g* abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 300 µl MACS-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 200 µl FcR

Blocking Reagent (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) und 200 µl BDCA-4 *Micro Beads* wurden die Zellen 15 Minuten bei 5°C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde das Tube mit MACS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 5°C und 300 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Wie unter B.2.9.2. beschrieben wurden die Säulen für die Separation in den Magneten eingesetzt und mit 1 ml MACS-Puffer äquilibriert. Danach wurden die Säulen mit der Zellsuspension beladen und anschließend 3-mal mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen.

Um die pDC zu eluieren, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, und 1 ml MACS-Puffer unter Verwendung eines Stempels durch die Säule gedrückt.

Die Zellsuspension wurde dann 10 Minuten bei 5°C und 300 x *g* zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 1 ml pDC-Medium (RPMI 1640 (PANbiotech, Aidenbach) mit 10% FKS, 1% L-Glutamin (200mM, Biochrom, Berlin), 1% MEM (non-essential Amino Acids, Gibco), 1 mM Natriumpyruvat und 1% PenStrep (Penicillin, Streptomycin, Gibco)) resuspendiert. Nachdem die erhaltenen Zellen ausgezählt waren, wurden je  $2 \times 10^4$  Zellen in 100 µl pDC-Medium mit Interleukin-3 (20ng/ml) pro Well in einer 48-Well-Platte (MultiwellTM; Becton Dickinson) ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

## **B.2.9. Stimulationsversuche**

### **B.2.9.1. Stimulation der dendritischen Zellen mit verschiedenen Pr55<sup>gag</sup> VLP**

Zur Durchführung der einzelnen Stimulationsversuche wurden die immaturen MDDC nach 5 Tagen Differenzierungszeit aus den Flaschen abgesaugt, abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml DC-Medium aufgenommen und die Zellen ausgezählt. Für die Stimulation wurden in jedes Well einer 24-Well-Mikrotiterplatte (MultiwellTM; Becton Dickinson)  $5 \times 10^5$  MDDC in 500 µl DC-Medium mit Zytokinen (IL-4 und GM-CSF, je 500 U/ml) eingesetzt und diese für 48 Stunden mit den verschiedenen VLP (je 10 µg), Wildtyp-Baculoviren (10 µg) oder Überstand nicht infizierter High Five™ Zellen (10 µg) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 0,4 µg LPS (Lipopolysaccharide) stimuliert und als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die nur in DC-Medium inkubiert wurden.

Zur Stimulation der pDC wurden baculovirale VLP (10 µg), Überstand nicht infizierter High Five™ Zellen (10 µg), CpG ODN (A-class oder C-class, je 10 µg) oder LPS (1 µg) zu den Zellen gegeben. Die pDC wurden ebenfalls für 48 Stunden mit den unterschiedlichen Stimuli inkubiert.

Um anschließend die Expression der Oberflächenmarker mittels FACS-Messungen (*Fluorescence activated cell sorting*) und die Zytokinproduktion mittels ELISA zu analysieren, wurden die Wells mit den MDDC mit DC-Medium auf 1 ml, die Wells mit den pDC mit pDC-Medium auf 0,5 ml aufgefüllt, die Zellen mit der Pipettenspitze von der Platte entfernt, aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gegeben. Diese Röhrchen wurden dann bei 4°C für 5 Minuten bei 300 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reagenzgefäß überführt und bei –80°C für spätere Zytokinmessungen eingefroren. Das vorhandene Pellet wurde in 1 ml FACS-Puffer (PBS mit 1 % FKS und 0,1 % Na<sub>3</sub>N) aufgenommen, resuspendiert und bei 4°C für maximal 24 Stunden aufbewahrt.

#### **B.2.9.2. Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA**

Um die DNA besser in die Zellen einschleusen zu können, wurde für einen Ansatz *FuGENE® HD Transfection Reagent* (Roche, Mannheim) verwendet. Diese Substanz bildet einen Komplex mit DNA und transportiert diesen Komplex in die Zelle. Daher wird *FuGENE®* oft für Transfektionen eingesetzt. Es hat den Vorteil, dass es eine hohe Transfektionseffizienz aufweist und darüber hinaus wenig zytotoxisch wirkt.

Für die Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA wurden zunächst *FuGENE®*, DNA und RPMI 1640 Medium (ohne FKS) auf Raumtemperatur aufgewärmt. *FuGENE®* musste vor dem Gebrauch gut gemischt werden.

In sterilen Eppendorf-Reagenzgefäßen wurden anschließend die verschiedenen Stimulationsansätze vorbereitet. Dazu wurden zuerst in jedes Reagenzgefäß 100 µl RPMI 1640 pipettiert und mit folgenden Stimuli vermischt:

2 µg baculovirale DNA (Endkonzentration im Ansatz: 0,02 µg DNA/µl)

gesamter Ansatz der mit Nuklease verdauten DNA (siehe B.2.6.3.)

Negativkontrolle zum DNA-Verdau (siehe B.2.6.3.)

2 µg baculovirale DNA und 6 µl *FuGENE®*

gesamter Ansatz der mit Nuklease verdauten DNA und 6 µl *FuGENE®*

Negativkontrolle zum DNA-Verdau und 6 µl *FuGENE®*

Bei der Zugabe von FuGENE® musste vermieden werden, die Gefäßwand mit der Pipettenspitze zu berühren. Es wurde ein Verhältnis von FuGENE®: DNA von 3:1 gewählt. Anschließend wurden die Ansätze durch Schnippen gegen die Gefäßwand gut vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die MDDC wie unter B.2.10.1. beschrieben aufbereitet und auf einer 24-Well-Platte ausgesät ( $5 \times 10^5$  Zellen in 500 µl DC-Medium pro Well). Schließlich wurden die Stimulationsansätze langsam dazu pipettiert, wobei darauf geachtet wurde die Pipettenspitze unter die Oberfläche des Mediums zu tauchen. Um die MDDC mit den Stimuli zu mischen wurde die Platte durch kreisende Bewegungen auf der Unterlage geschwenkt. Die Zellen wurden wie bei den anderen Stimulationsversuchen für 48 Stunden inkubiert und anschließend wie unter B.2.10.1 aufbereitet.

### **B.2.9.3. Quantifizierung der Oberflächenexpressionsmarker mittels FACS**

Die FACS-Analyse beschreibt ein Verfahren, das auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle beruht, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Zwei Parameter spielen hierbei eine Rolle: das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) als Maß für die Komplexität und/oder Granularität (Größe und Inhalt der Zelle). Finden sich beispielsweise in der Zelle sehr viele Lysosomen (kleine Enzym-speichernde Bläschen), auch Granula genannt, so hat diese Zelle ein sehr großes Seitwärtsstreulicht. Um diese Streuungen zu veranschaulichen, werden die Zellen in einem so genannten *Dot-Plot* als Punkt dargestellt. Dieser *Dot-Plot* ist charakterisiert durch das Vorwärtsstreulicht, das meist auf der X-Achse dargestellt wird und durch das Seitwärtsstreulicht, das meist auf der y-Achse aufgetragen wird.

Mit der FACS-Analyse lassen sich neben der Größe und der Komplexität der Zelle auch an Antikörper gebundene Fluorochrome nachweisen. Findet nun eine Antigen-Antikörper-Reaktion statt, so lässt sich die Expression von Antigenen auf der Oberfläche oder intrazellulär bestimmen. Die Proben werden dazu mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, verbunden mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen, inkubiert. Die Antikörper sind gegen bestimmte Oberflächenproteine (z.B. *CD Cluster of differentiation*) gerichtet.

Aus einer Einzelzellsuspension werden die Zellen mithilfe von Druckluft in eine Kapillare gedrückt. Ein kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom sorgt für die gleichmäßige Verteilung der Probe. Die Zellen werden dann an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet (Abb. B.3) und durch die exakte Anregung der Fluorochrome durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Unter Abgabe der Energie in Form von emittierten Lichts fallen die Fluorochrome auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Durch einen Photodetektor mit entsprechendem Filter wird dabei die emittierte Photonenkonzentration gemessen, die sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper/Zelle verhält. Bei der FACS-Analyse lassen sich durch die entsprechende Wahl der Wellenlänge sowie der Filter parallel verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe messen, wenn sich die Farbstoffe zwar bei der gleichen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche Emissionsspektren verfügen.



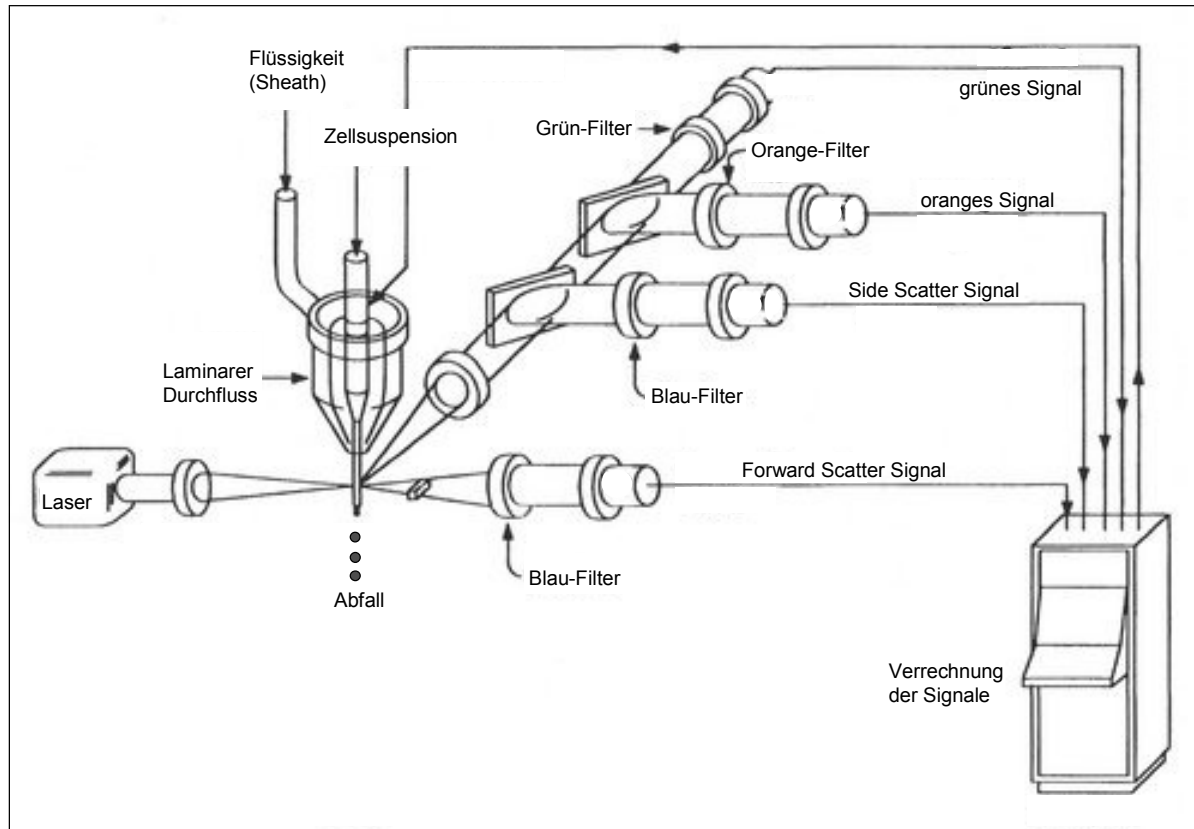


Abb. B.3: Schematische Darstellung eines FACS-Gerätes

Die mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen werden durch eine dünne Kapillare am Laser geeigneter Wellenlänge (hier: blauer Argonlaser) vorbeigeleitet, wobei die Fluorochrome auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Unter Abgabe von Energie fallen sie dann wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die dabei freigesetzte Photonenkonzentration wird gemessen und entspricht proportional der Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zellen, die keinen Antikörper gebunden haben, erscheinen negativ. Mithilfe des *Forward Scatters* wird die Größe, mit dem *Side Scatter* die Granularität der vorbeigeleiteten Zellen bestimmt.

Zur Bestimmung der Maturation der MDCC wurden die in den FACS-Röhrchen als Pellet vorgelegten Zellen in 1,5 ml FACS-Puffer resuspendiert und bei 300 x g und 4°C für 5 Minuten wieder abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, und die Zellpellets wurden in je 100 µl FACS Puffer, der den entsprechenden Antikörper (1:100) enthielt, resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Im Anschluss daran wurden 1,5 ml FACS-Puffer zu den Proben gegeben und 5 Minuten bei 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt. Die Proben wurden in je 300-500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Das anschließende Auslesen erfolgte am FACS-Gerät

(Beckman Coulter; Epics XL.MCL), die Datenauswertung wurde mithilfe der Software FCS Express V3 durchgeführt.

Verwendete Antikörper:

Name	Quelle
CD80-FITC	BD
CD83-PE	BD
CD86-PE-Cy5	BD
HLA-DR-ECD	Coulter
CD40-FITC	BD
CCR 7-PE	R&D

#### B.2.9.4. Quantifizierung der Zytokinproduktion mittels ELISA

Der ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert, die mithilfe eines Photometers gemessen wird. Die klassische ELISA Technik, die hier angewandt wurde, verwendet zwei Antikörper, die hoch spezifisch an das nachzuweisende Antigen binden. Für die Durchführung des IFN- $\alpha$  ELISAs wurde das IFN-alpha Module Set (Bender MedSystems GmbH, Wien) verwendet, für die IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF ELISAs das jeweilige BD OptEIA™ Set Human (BD Biosciences, Heidelberg). Zunächst wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (NUNC Maxi Sorb Platten) mit 100  $\mu$ l/Well des ersten Antikörpers (*Capture Antibody*) gelöst in *Coating Buffer* (0,1 M Natrium Carbonat, 8,4 g NaHCO<sub>3</sub>, 3,56 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 1,0 Liter; pH 9,5) (Verdünnung 1:250) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für den IFN- $\alpha$  ELISA wurde der erste Antikörper (*Coating Antibody*) in PBS gelöst (Verdünnung 1:10) und ebenfalls 100  $\mu$ l pro Well davon eingesetzt. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung verworfen und jedes Well 3-mal mit mindestens 200  $\mu$ l Wasch Puffer (PBS mit 10 % Tween20) gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 200  $\mu$ l *Assay Diluent* (PBS mit 10 % FKS; pH 7; für den IFN- $\alpha$  ELISA: PBS mit 10% FKS und 0,05% Tween20) pro Well für 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur abgeblockt und danach wieder 3-mal gewaschen. In der Zwischenzeit wurden die Standards und die Proben in den jeweiligen Verdünnungen mit *Assay Diluent*

vorbereitet. Für die IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF ELISAs wurden jeweils 100 µl von jeder Standardverdünnung und von jeder Probe in die entsprechenden Wells der Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte erneut mit 300 µl Wasch Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurden dann 100 µl des *Working Detectors (Detection Antibody* (Verdünnung 1:250 bzw. für IL-10 1:500) und *AvHRP (avidin-horseradish peroxidase conjugate))* in alle Wells gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Antikörperlösung verworfen und die Platte 7-mal gewaschen. In jedes Well wurden dann 100 µl der Substrat Lösung pipettiert und die Platte für 5 - 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden sofort 50 µl der Stop-Lösung (0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in jedes Well gegeben, um die Farbreaktion zu unterbrechen. Die Absorption bei 450 nm wurde nach dem Stoppen der Reaktion photometrisch (Biorad, Microplate Reader 680) bestimmt. Für den IFN-α ELISA wurden nach dem Blocken je 100 µl der Standardverdünnungen und der Proben in die entsprechenden Wells pipettiert. Anschließend wurden pro Well 50 µl *HRP Conjugate* zugegeben und die Platten 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen erfolgte die Färbereaktion mit 100 µl *TMB Substrate Solution* für ca. 15 Minuten im Dunkeln. Schließlich wurden 100 µl der Stop-Lösung in jedes Well pipettiert und die Absorption bei 450 nm wie oben beschrieben ausgelesen.

## **B.2.10. Elektronenmikroskopie**

### **B.2.10.1. Aufbereitung der VLP für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen**

Für die elektronenmikroskopischen Analysen wurden baculovirale VLP mittels Saccharosegradientenzentrifugation aufgetrennt und die erhaltenen Fraktionen mittels Westernblotanalysen und Coomassie Färbung bezüglich der Konzentration und Reinheit der VLP überprüft. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Saccharosefraktionen verwendet, die hohe Konzentrationen der VLP mit der erforderlichen Reinheit aufwiesen. Alle nachfolgenden elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. Schröder, Institut für Pathologie, Regensburg durchgeführt.

### B.2.10.2. Negative Staining

Die zu untersuchende, Pr55<sup>gag</sup>-haltige Saccharosefraktion wurde mittels der so genannten Tropfenmethode auf ein beglimmtes, mit Kunststoff- und Kohlefolie befilmtes Trägernetzchen (*Grid*) aufgebracht. Dazu wurde das *Grid* für 10 Minuten auf einen Tropfen der Saccharosefraktion aufgelegt. Die VLP steigen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an die Oberfläche des Tropfens und bleiben an der Kunststoffolie des *Grids* haften.

Nach kurzem Antrocknen der Probe wurde das *Grid* zur Kontrastierung für 1 Minute auf einen Tropfen 2% Phosphorwolframsäure gelegt und vor dem Mikroskopieren 30 Minuten luftgetrocknet. Die Schwermetalllösung trocknet amorph um die auf der Trägerfolie haftenden Partikel ein und bildet eine vom Elektronenstrahl nicht durchstrahlbare Schicht, die Partikel erscheinen daher hell in dunkler Umgebung.

### B.2.10.3. Immunogoldlabelling

Der Nachweis des Baculovirusoberflächenproteins gp64 auf VLP und Baculoviren erfolgte durch eine Immunogoldmarkierung des Proteins.

Für eine optimale Markierung des gp64 wurden vier verschiedene Immunogoldlabelling-Ansätze und zwei Kontrollansätze durchgeführt. Markiert wurden Aliquots der Pr55<sup>Gag</sup>-haltigen Fraktion des Saccharosegradienten, die zuvor mittels *Negative Staining* kontrastiert wurden.

Labelling-Ansätze:

Ansatz	Verdünnung* des anti-gp64 Antikörpers	Verwendeter goldmarkierter Antikörper (1:20 Verdünnung*)
1	1:40	6 nm Gold
2	1:40	10 nm Gold
3	1:70	6 nm Gold
4	1:70	10 nm Gold

(\*) Alle Verdünnungen wurden mit PBS durchgeführt

Als Spezifitätskontrollen dienten VLP Aliquots, die mit einem unspezifischen Primärantikörper (1:40 Verdünnung) in Kombination mit dem 6 nm Gold-markierten

Sekundärantikörper oder nur mit dem 6 nm Gold-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert wurden.

Die für das Immunogoldlabelling notwendigen Inkubations- und Waschschrte wurden mithilfe des EM-IGL Automat (Leica, Wien) durchgeführt. Dieses Gerät dient zur reproduzierbaren Erzeugung von Immuogoldmarkierungen. Folgende Schritte mit angegebenen Zeiten wurden von dem Automaten durchgeführt:

Schritt	Zeit [min]	Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
1	60	1:40 bzw. 1:70 Verdünnung des anti-gp64-Antikörpers	5
2	1	PBS, 1% BSA	30
3	1	PBS, 1% BSA	30
4	1	PBS, 1% BSA	30
5	1	PBS, 1% BSA	30
6	1	PBS, 1% BSA	30
7	30	1:20 Verdünnung des anti-Maus mit 6 bzw. 10 nm Gold gekoppelten Antikörpers	5
8	1	PBS, 1% BSA	30
9	1	PBS, 1% BSA	30
10	1	PBS, 1% BSA	30
11	10	PBS, 2% Glutaraldehyd	30
12	2	H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub>	30
13	2	H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub>	30
14	Pause	Trocknen	
15		Ende	

#### B.2.10.4. Ultrastrukturelle Gewebe- bzw. Zelluntersuchung

Um die Aufnahme von baculoviralen VLP durch MDDC mittels Elektronenmikroskopie zu verfolgen, wurden auf einer 6-Well-Platte (MultiwellTM; Becton Dickinson)  $2 \times 10^6$  MDDC in 2 ml Medium pro Well ausgesät und mit je 800  $\mu$ g baculoviralen VLP für 30 Minuten, 1,5 Stunden oder 3 Stunden stimuliert. Nach dem

Ernten wurden die Zellen jeweils in ein 2 ml Reagenzgefäß überführt und 10 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert.

Das Pellet wurde anschließend für die elektronenmikroskopische Untersuchung in 2 ml 0,1 M Cacodylat-gepuffertem Karnovsky-Fixativ (2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd) aufgenommen und bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Nach Einschließen des Zellpellets in 4% Agarose wurden die Zellen 2 Stunden mit 1% Osmiumtetroxid (pH 7,3) nachfixiert. Die Dehydration der Proben in einer Ethanolreihe steigender Konzentrationen sowie die Einbettung in das Epoxydharz EMBED 812 (alle Reagenzien von Science Services / München) erfolgte standardisiert im LYNX-Einbettautomaten (Leica / Bensheim). Nach der Hitze-polymerisation der Proben bei 60°C für 48 Stunden wurden Semidünnschnitte (Übersichtsschnitte, 0,75 µm dick) angefertigt, die mit Toluidin-Blau und basischem Fuchsin doppelgefärbt wurden. Von den anhand der Semidünnschnitte lichtmikroskopisch ausgewählten relevanten Probenarealen wurden mit einem Ultracut-S Ultramikrotom (Leica / Bensheim) Ultradünnschnitte (80 nm dick) hergestellt, die für je 10 Minuten mit wässriger 2% Uranylacetat- und Bleicitratlösung kontrastiert wurden. Ausgewertet wurden die Schnitte an einem 80kV LEO 912AB Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss / Oberkochen); die Bilddokumentation erfolgte dabei mit einer CCD-Kamera (Proscan / Lagerlechfeld) und der ITEM-Software, Ver. 5.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH / Münster).

#### **B.2.11. Fluoreszenzmikroskopie**

Für die Analyse der Aufnahme von den verschiedenen VLP durch MDCC wurden je  $5 \times 10^5$  MDCC in 500 µl DC-Medium pro Well auf einer 24-Well-Platte (MultiwellTM; Becton Dickinson) ausgesät und mit je 50 µg CFDA SE-markierten VLP für 2 oder 24 Stunden inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen geerntet, in FACS-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 300 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Davon wurden 300 µl in ein neues FACS-Röhrchen überführt, erneut zentrifugiert und in 150 µl einer DAPI-Lösung (1:100 Verdünnung, Exc359/Em461, Roche, Mannheim) zur Anfärbung der Zellkerne resuspendiert. Der Rest wurde zur FACS-Analyse verwendet. Die mit der DAPI-Verdünnung resuspendierten Zellen wurden 15 Minuten lichtgeschützt bei 5°C inkubiert, danach

zentrifugiert und mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen, schließlich nochmals zentrifugiert und in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proben auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Multiwell™; Becton Dickinson) überführt. Die Aufnahmen erfolgten an einem AxioVert 200M Mikroskop (Zeiss, Göttingen) und wurden mithilfe der Software AxioVision LE Rel. 4.5 bearbeitet.

## C. Ergebnisse

### C.1. Etablierung eines ex vivo Modells humaner dendritischer Zellen

Für die Durchführung von Maturations- und Aktivierungsstudien an Zellen des humanen angeborenen Immunsystems wurden humane dendritische Zellen verwendet. Diese Zellen können zum einen aus Monozyten aus dem peripheren Blut generiert werden. Durch die Zugabe von GM-CSF und IL-4 differenzieren die Monozyten zu immaturren dendritischen Zellen, den so genannten MDDCs (*monocyte derived dendritic cells*) (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Zum anderen können dendritische Zellen direkt aus dem peripheren Blut isoliert werden. Auf diese Weise wurden die verwendeten pDC (*plasmacytoid dendritic cells*) gewonnen. Vor ihrem Einsatz in den entsprechenden Versuchen erfolgte eine Untersuchung der jeweiligen Zellpopulationen bezüglich ihrer Reinheit.

#### C.1.1. Reinheit der CD14<sup>+</sup> Monozyten

Für die Generierung von humanen MDDC erfolgte zunächst die Isolierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten aus PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) durch positive Selektion. Zur Reinheitsbestimmung dieser CD14<sup>+</sup> Zellen wurden verschiedene Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse untersucht (Abb. C.1).

Hierbei konnte eine Reinheit von über 90% (93,4% CD14<sup>+</sup> Zellen) nachgewiesen werden. Außerdem waren die Monozyten positiv für HLA-DR (19,3%), CD4 (19,8%) und leicht positiv für den Chemokinrezeptor CCR7 (8,8%). Die Oberflächenproteine CD80, CD83, CD86, CD40 und CD1a wurden nicht exprimiert.



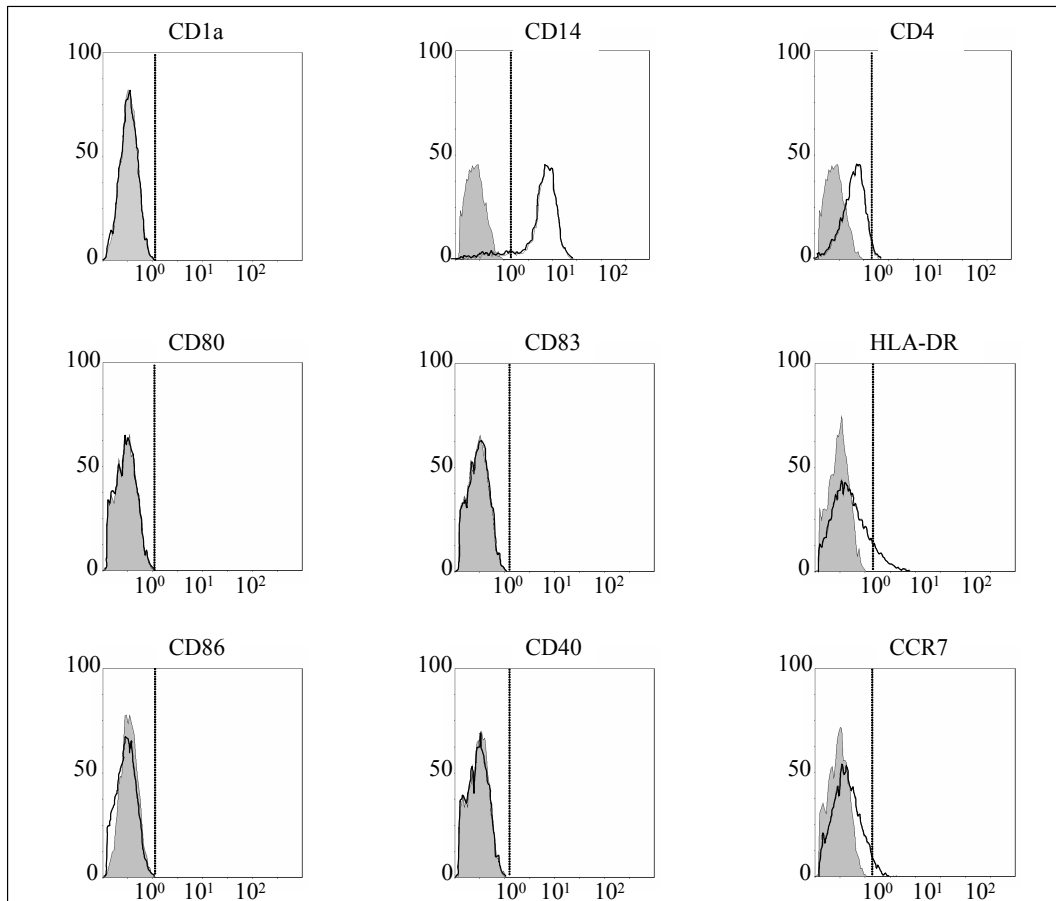


Abb. C.1: Bestimmung der Reinheit der Monozytenpopulation

Humane PBMC wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus Buffy Coat aufgereinigt. Die Anreicherung von  $CD14^+$  Monozyten erfolgte durch positive Selektion über MACS-Säulen unter Verwendung von CD14-Micro Beads. Anschließend wurde die Reinheit der isolierten Zellpopulation durchflusszytometrisch ausgewertet, wobei die Zellen mit verschiedenen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern, die spezifisch gegen die angegebenen Oberflächenmarker gerichtet sind, markiert wurden.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: nicht markierte Zellen; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen.

### C.1.2. Ausbeute an MDCC

Immature humane MDCC exprimieren auf ihrer Oberfläche CD1a. Anhand dieses Oberflächenmarkers wurde mittels FACS-Analyse die Anzahl an Monozyten, die zu MDCC differenziert werden konnten, ermittelt (Abb. C.2). Die Ausbeute an  $CD1a^+$  Zellen lag je nach Blutspender bei Werten um 90%.

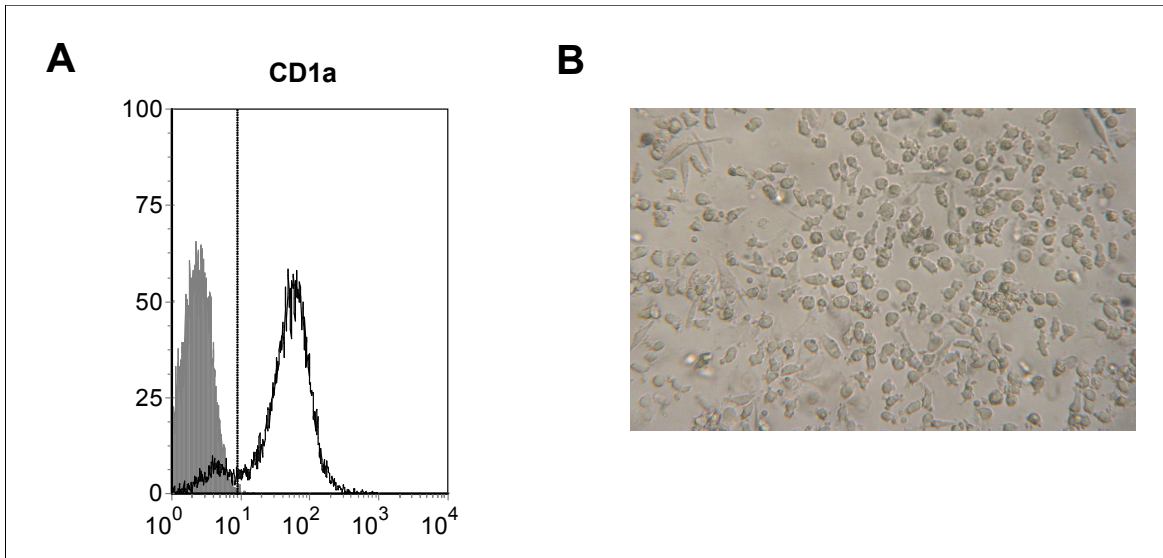


Abb. C.2: Bestimmung der Ausbeute an  $CD1a^+$  Zellen

Durch 5-tägige Kultivierung von  $CD14^+$  Monozyten unter Zugabe von GM-CSF und IL-4 wurden immature  $CD1a^+$  MDDC generiert.

(A) FACS-Analyse der immaturen  $CD1a^+$  MDDC: Die Zellen wurden mit einem PE-gekoppelten anti- $CD1a$  Antikörper markiert und die Anzahl an  $CD1a^+$  Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: nicht markierte Zellen; schwarze Kurve: mit Antikörper gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

(B) Lichtmikroskopische Aufnahme von immaturen MDDC.

### C.1.3. Reinheit der pDC

Humane pDC, die  $CD304$  (BDCA-4/Neutrophilin-1) und  $CD303$  (BDCA-2) auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurden aus PBMC mittels positiver Selektion über MACS-Säulen isoliert und anschließend die Ausbeute per FACS-Analyse ermittelt (Abb. C.3). Es zeigte sich hierbei eine Reinheit von ca. 69%  $BDCA-2^+$  Zellen.

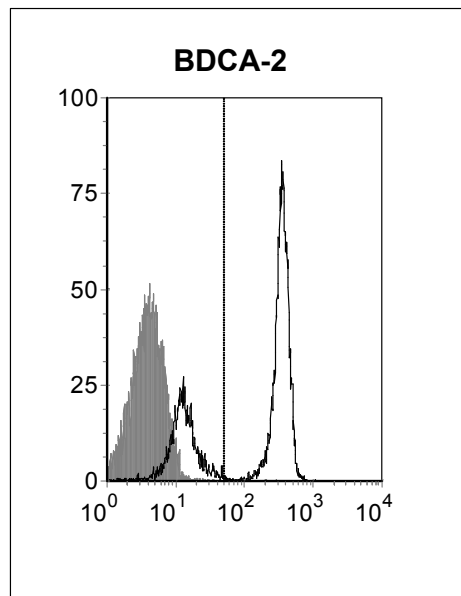


Abb. C.3: Bestimmung der Ausbeute an pDC

Humane PBMC wurden mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation aus Buffy Coat aufgereinigt. Die Anreicherung von BDCA-4<sup>+</sup> Zellen erfolgte durch positive Selektion über MACS-Säulen unter Verwendung von BDCA-4-Micro Beads. Anschließend wurden die Zellen mit einem FITC-gekoppelten anti-BDCA-2 Antikörper markiert und die Anzahl an BDCA-2<sup>+</sup> Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: nicht markierte Zellen; schwarze Kurve: mit Antikörper gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

## C.2. Biochemische Analyse der Pr55<sup>Gag</sup> VLP aus verschiedenen Expressionssystemen

Der erste Abschnitt dieser Arbeit beschreibt die Herstellung und biochemische Analyse von Pr55<sup>Gag</sup> VLP im Säuger- bzw. im baculoviralen Expressionssystem. Die Säuger-VLP wurden von Melanie Wiesel, die baculoviralen VLP von Simon Bredl im Rahmen ihrer Diplomarbeiten produziert und für die Stimulationsversuche zur Verfügung gestellt (Bredl, 2005; Wiesel, 2006).

### C.2.1. Coomassie und Immunoblotanalysen von Säuger VLP

Zur Produktion von verschiedenen Pr55<sup>Gag</sup> VLP-Derivaten im Säuger-Expressionssystem (Säuger-VLP (*mammalian* VLP, mVLP)) wurden 293T Zellen mit *pcDNA3.1/III<sub>BS</sub>syngag* oder *pcsyngagOVA\_gp64* transient transfiziert und die Partikel anschließend aufgereinigt.

Zur Charakterisierung der erhaltenen mVLP Präparationen wurden diese über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung und Westernblot

analysiert (Abb. C.4). Als Kontrolle dienten in gleicher Weise aufgereinigte Überstände von mit *pcDNA3.1* transfizierten 293T Zellen.

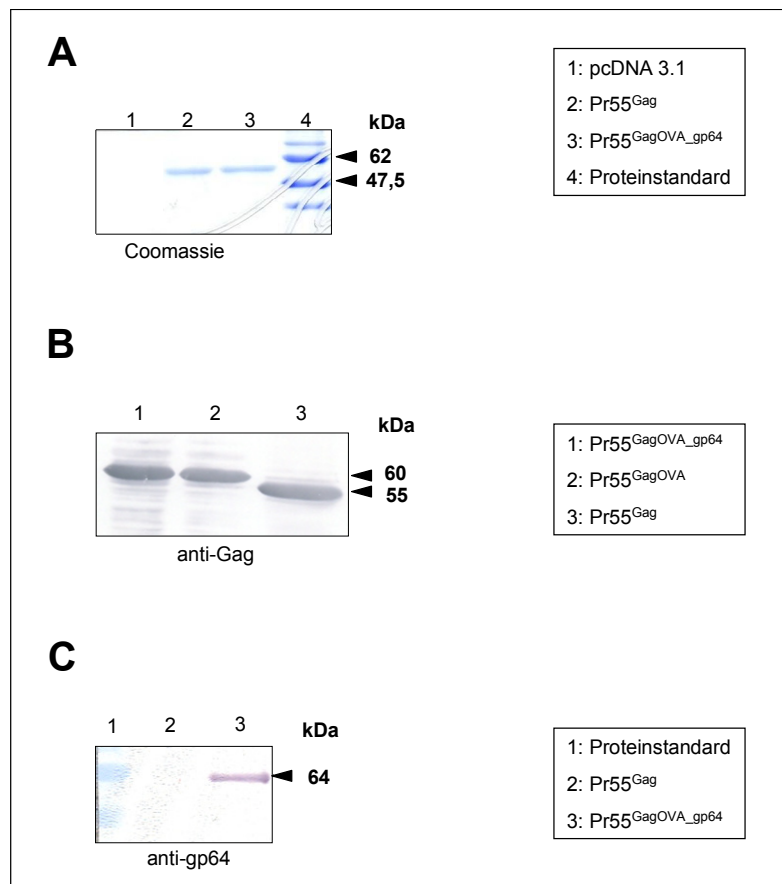


Abb. C.4: Biochemische Analyse der eukaryontischen VLP

Die Produktion der Partikel erfolgte mithilfe von transienter Transfektion von 293T Zellen und anschließender Aufreinigung der Überstände über ein 30%-iges Saccharosekissen. Je 5 µg Gesamtprotein der Präparationen wurden auf ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Als Negativkontrolle dienten Überstände von mit Leervektor (*pcDNA3.1*) transfizierten 293T Zellen. Bei dem verwendeten Proteinstandard handelt es sich um den Precision Plus Protein™ Standard.

- (A) Coomassiefärbung des 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels mit den aufgetrennten VLP Präparationen.
- (B) Westernblotanalyse der unterschiedlichen Partikelpräparationen unter Verwendung des monoklonalen Pr55<sup>Gag</sup> spezifischen 13/5 Maus Antikörpers (1:500) und eines sekundären anti-Maus AP-gekoppelten Antikörpers (1:2000).
- (C) Westernblotanalyse der Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup> Partikel unter Verwendung eines gp64-spezifischen monoklonalen Antikörpers (AcV5) (1:500).

(Vgl. Wiesel, 2006)

Die Reinheit der erzeugten Partikel konnte im Coomassiegel nachgewiesen werden (Abb. C.4 A). Die Gag-Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa war bei den Pr55<sup>Gag</sup>-Partikeln (Spur 2) gut zu sehen. Bei den Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup>-Partikeln (Spur 3) ließ sich die GagOVA-Bande mit einem erhöhten Molekulargewicht von 59,7 kDa bedingt durch die OVA Fusion detektieren. Dagegen konnte man die gp64 Bande nur erahnen.

In den anschließenden Westernblotanalysen (Abb. C.4 B) konnte unter Verwendung des Pr55<sup>Gag</sup>-spezifischen Antikörpers (13/5), der an p24 bindet, die Identität der Gag- und der GagOVA-Bande bestätigt werden. Neben dem Gag-Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kDa wurden von dem spezifischen Antikörper noch weitere Banden mit einem geringeren Molekulargewicht detektiert, bei welchen es sich wahrscheinlich um Abbaubanden oder Fragmente des Gag-Proteins, die aus einem Gag-internen Start-Codon resultieren, handelt. Die gp64 Bande der Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup>-Partikel wurde mit einem gp64-spezifischen Antikörper (AcV5) nachgewiesen (Abb. C.4 C).

### C.2.2. Coomassie und Immunoblotanalysen von baculoviralen VLP

Zur Produktion von Pr55<sup>Gag</sup> VLP mittels des Baculovirus-Expressionssystems (= baculovirale VLP (bvVLP)) wurden High Five<sup>TM</sup> Zellen mit dem Gag-rekombinanten Baculovirus „Ac-Gag“ infiziert und die Partikel nach 72 Stunden aufgereinigt.

Zur Charakterisierung der erhaltenen bvVLP Präparationen wurden Proben davon über ein SDS-Acrylamidgel aufgetrennt und mittels Coomassiefärbung und Westernblot analysiert (Abb. C.5). Als Kontrolle dienten Überstände nicht infizierter High Five<sup>TM</sup> Zellen (Abb. C.5, Spur 1), die in analoger Weise aufgereinigt wurden.

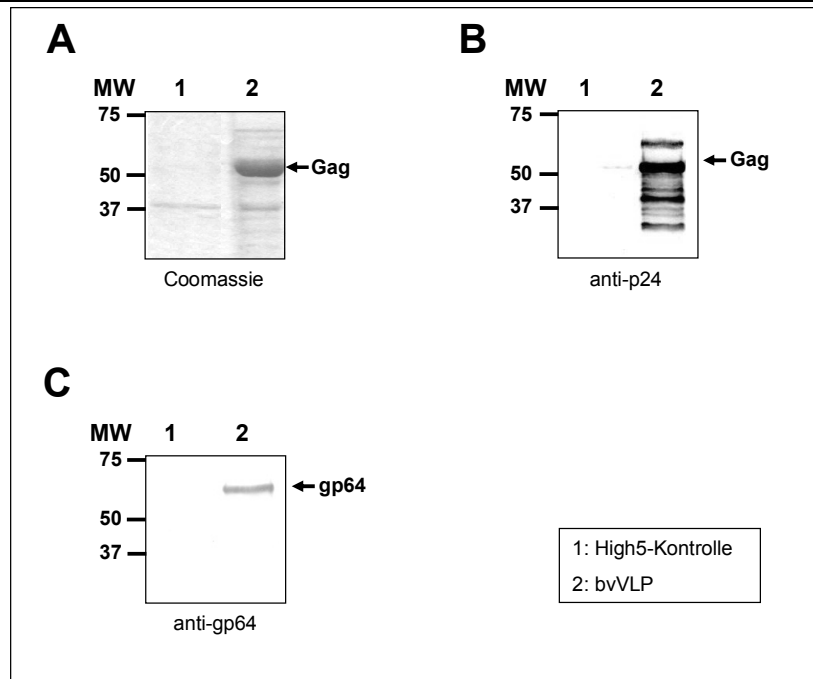


Abb. C.5: Biochemische Analyse der baculoviralen VLP

Zur Produktion von bvVLP wurden High Five<sup>TM</sup> Zellen mit dem Gag-rekombinanten Baculovirus Ac-Gag infiziert und nach 72 Stunden die Überstände über ein 30%-iges Saccharosekissen aufgereinigt. Je 5 µg Gesamtprotein der Präparationen wurden auf einem 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle dienten Überstände nicht infizierter High Five<sup>TM</sup> Zellen.

- (A) Coomassiefärbung des 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels mit der aufgetrennten bvVLP Präparation.
- (B) Westernblotanalyse des 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels unter Verwendung des Pr55<sup>gag</sup> spezifischen 13/5 Antikörpers.
- (C) Westernblotanalyse des 12,5%-igen SDS-Polyacrylamidgels unter Verwendung des gp64-spezifischen Antikörpers (AcV5).

Abkürzungen: MW: molecular weight, Molekulargewicht in kDa.

(Vgl. Bredl, 2005)

Unter Verwendung des Pr55<sup>gag</sup>-spezifischen Antikörpers (13/5) und des gp64-spezifischen Antikörpers (AcV5) konnte mittels Westernblot die Anwesenheit des Pr55<sup>Gag</sup> Proteins (Abb. C.5 B) sowie des baculoviralen Hüllproteins gp64 (Abb. C.5 C) in den Präparationen aus mit Ac-Gag infizierten High Five<sup>TM</sup> Zellen, nicht aber in den Proteinpräparationen aus nicht infizierten High Five<sup>TM</sup> Zellen nachgewiesen werden. Die Identität der mit dem Pr55<sup>gag</sup>-spezifischen Antikörpers (13/5) angefärbten Bande mit einem Molekulargewicht von 66 kDa (Abb. C.5 B) ist unklar. Diese Bande tritt jedoch nicht in dem Kontrollansatz mit nicht infizierten Zellen auf, was auf die Spezifität der Bande hinweist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein C-terminal verlängertes Gag-Protein, das infolge eines Überlesens des Stop-

Codons gebildet wird. Die ebenfalls spezifisch angefärbten Banden mit geringerem Molekulargewicht sind wahrscheinlich Abbaubanden des Gag-Proteins, wie bereits unter C.2.1. geschildert.

### **C.2.3. Dichtebestimmung der verschiedenen Pr55<sup>Gag</sup> VLP**

Zum Nachweis der partikulären Struktur der verschiedenen VLP und um die Partikel aus den unterschiedlichen Expressionssystemen zu vergleichen, wurden die Säuger- (mVLP) und baculoviralen VLP (bvVLP) über einen kontinuierlichen Saccharosegradienten zentrifugiert. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und unter Verwendung des Gag-spezifischen Antikörpers (13/5) und des gp64-spezifischen Antikörpers (AcV5) mittels Westernblot untersucht.

In der Untersuchung der mVLP (Abb. C.6) wurden bei den Pr55<sup>Gag</sup>-Partikeln 21, bei den Pr55<sup>GagOVA-gp64</sup>-Partikeln 20 Fraktionen gewonnen, wobei bei allen Partikeln die stärkste Gag-Bande jeweils in Fraktion 12 detektiert wurde. Die stärkste gp64-Bande bei den Pr55<sup>GagOVA-gp64</sup>-VLP konnte ebenfalls in Fraktion 12 nachgewiesen werden, was ein Indiz für die Präsenz des gp64-Proteins auf diesen Partikeln ist. Insgesamt unterschieden sich die verschiedenen mVLP nur wenig in ihrer Dichte.

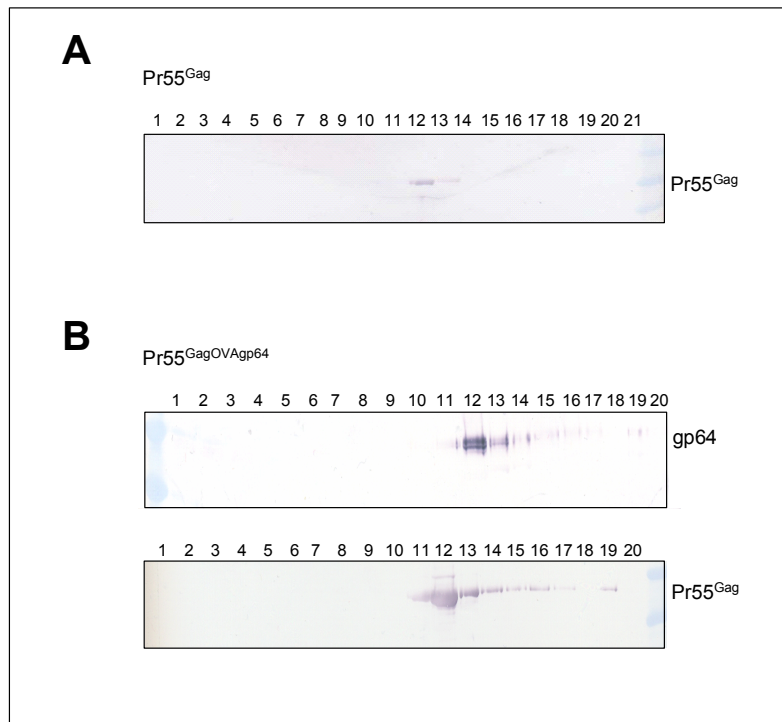


Abb. C.6: Sedimentation von mVLP in einem Saccharose-Dichtegradienten

Zellkulturüberstände von 293T Zellen wurden nach transienter Transfektion mit pcDNA3.1/III<sub>BS</sub>syngag oder pcsyagOVA\_gp64 geerntet, durch Ultrazentrifugation über ein 30%-iges Saccharosekissen vorgereinigt und anschließend über einem 10 bis 50%-igen Saccharose-Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

- (A) Westernblotanalyse der Pr55<sup>Gag</sup> Partikel unter Verwendung eines Pr55<sup>Gag</sup> spezifischen Antikörpers.
- (B) Westernblotanalyse der Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup> Partikel unter Verwendung eines Pr55<sup>Gag</sup>- und eines gp64-spezifischen Antikörpers.

Abkürzungen: 1 bis 21: Fraktionen des Saccharosegradienten  
(Vgl. Wiesel, 2006)

Bei der Analyse der bvVLP (Abb. C.7) konnten 18 Fraktionen gewonnen werden, wobei Pr55<sup>Gag</sup> und gp64 jeweils in den Fraktionen 10 bis 18 nachgewiesen wurden. Die höchsten Konzentrationen der beiden untersuchten Proteine befanden sich jeweils in Fraktion 12. Das Vorhandensein beider Proteine in denselben Fraktionen kann als Indiz dafür gewertet werden, dass sich gp64 Proteine auf der Oberfläche der bvVLP befinden.



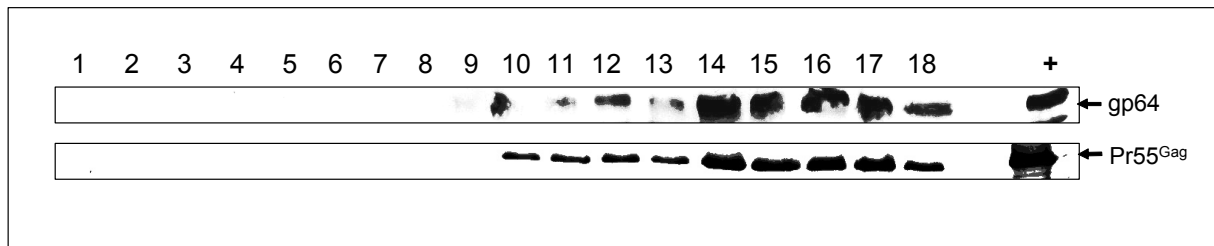


Abb. C.7: Sedimentation von bvVLP in einem Saccharose-Dichtegradienten

Zellkulturüberstände von High Five<sup>TM</sup> Zellen wurden nach Infektion mit Ac-Gag geerntet, durch Ultrazentrifugation über ein 30%-iges Saccharosekissen vorgereinigt und anschließend über einem 10 bis 50%-igem Saccharose-Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden über ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot mit dem Pr55<sup>Gag</sup>- (13/5) und dem gp64-spezifischen Antikörper (AcV5) entwickelt.

Abkürzungen: 1 bis 18: Fraktionen des Saccharosegradienten; +: Positivkontrolle (Ac-Gag Präparation).

(Vgl. Bredl, 2005)

Mithilfe der Saccharosegradienten-Zentrifugation konnte gezeigt werden, dass es sich bei den verschiedenen mVLP und bvVLP nicht nur um unspezifische Proteinzusammenlagerungen, sondern um Partikel definierter Größe und Dichte handelt.

### C.3. Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften von baculoviralen VLP und Säuger-VLP

In den folgenden Experimenten wurden die immunstimulatorischen Eigenschaften der Säuger-VLP (mVLP) mit denen der baculoviralen VLP (bvVLP) verglichen. Hierzu wurden *monocyte derived dendritic cells (MDDC)* bzw. *plasmacytoid dendritic cells (pDC)* mit den VLP inkubiert und die Reaktion dieser Zellen anhand der Hochregulierung bestimmter Oberflächenproteine oder der Produktion gewisser Zytokine ausgewertet.

Immature MDDC können durch Stimulation mit Zytokinen, wie z.B. TNF- $\alpha$ , oder bakteriellen Substanzen, wie Lipopolysaccharide, zur Ausreifung gebracht werden (Sallusto et al., 1995; Aiba et al., 1997; Manome et al., 1999). Im Anschluss an eine Stimulation kann man bei den aus Monozyten generierten reifen Dendritischen Zellen die Hochregulierung der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, MHC-II und CD40

sowie des Chemokinrezeptors CCR7 beobachten (Aiba et al., 1997; Manome et al., 1999; Arrighi et al., 2001).

Eine weitere Eigenschaft von aktivierten MDCC ist die Produktion von Zytokinen. IFN- $\alpha$  (Interferon-alpha) spielt eine wichtige Rolle bei angeborenen Immunantworten auf virale Infekte. Es fördert die zell-vermittelte Immunität, verhindert die virale Replikation und erhöht die Expression von MHC-I Molekülen. TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) ist ein Hauptmediator der akuten inflammatorischen Antwort auf gram-negative Bakterien, wobei LPS den entscheidenden Stimulus für die TNF-Produktion darstellt. Die hauptsächliche Wirkung besteht in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu Infektionsherden und der Aktivierung dieser Zellen zur Eradikation von Mikroben. IL-6 (Interleukin-6) stimuliert die Synthese von Akut-Phase-Proteinen und die Produktion von Neutrophilen (angeborenes Immunsystem) sowie das Wachstum von B-Zellen (erworbenes Immunsystem) als Antwort auf verschiedene Mikroben und andere Zytokine wie z.B. IL-1 oder TNF. Die IL-12 (Interleukin-12)-Produktion wird durch mikrobielle Stimuli wie LPS, intrazelluläre Bakterien oder Virusinfektionen getriggert. Die Hauptwirkung stellt die Induktion zell-vermittelter Immunität dar. IL-10 (Interleukin-10) dient der Kontrolle der angeborenen Immunreaktionen und zell-vermittelter Immunität indem es aktivierte Makrophagen und dendritische Zellen inhibiert und somit überschießende Immunreaktionen verhindert.

PDC (plasmacytoid dendritic cells) sind eine Zellpopulation im peripheren Blut, welche eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem bei der Abwehr viraler Infektionen spielt. Diese dendritischen Zellen produzieren große Mengen an IFN- $\alpha$  als Antwort auf behüllte Viren, einige Bakterien und DNA mit CpG-Motiven. (Fanning et al., 2006). Die Erkennung von Pathogenen geschieht hierbei vornehmlich über die Erkennung von RNA- oder DNA-Genomen durch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) 7 und 9. Daraufhin erfolgt die Aktivierung von CD4- und CD8-T-Zellen (Asselin-Paturel et al., 2005; Liu 2005; Colonna et al., 2004). Somit bewirken die pDC eine Verbindung von angeborenem und erworbenem Immunsystem.

### **C.3.1. Stimulation von MDCC mit Säuger-VLP**

Humane immature MDCC wurden mit Pr55<sup>Gag</sup>-VLP stimuliert. Proteine aus Überständen von mit *pcDNA3.1* transfizierten 293T Zellen, die in gleicher Weise wie

die VLP aufgereinigt worden waren, wurden als eine Kontrolle verwendet. Als Positivkontrolle dienten MDDC, die mit LPS stimuliert wurden, und als Negativkontrolle wurden MDDC eingesetzt, die nur in DC-Medium inkubiert wurden.

#### **C.3.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit Säuger-VLP**

Nach der Stimulation mit den verschiedenen mVLP wurden die MDDC mit verschiedenen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt, die gegen die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 und CD40, das MHC-Klasse II Molekül HLA-DR oder den Chemokinrezeptor CCR7 gerichtet sind, um die Maturation der Zellen mittels FACS zu analysieren (Abb. C.8).

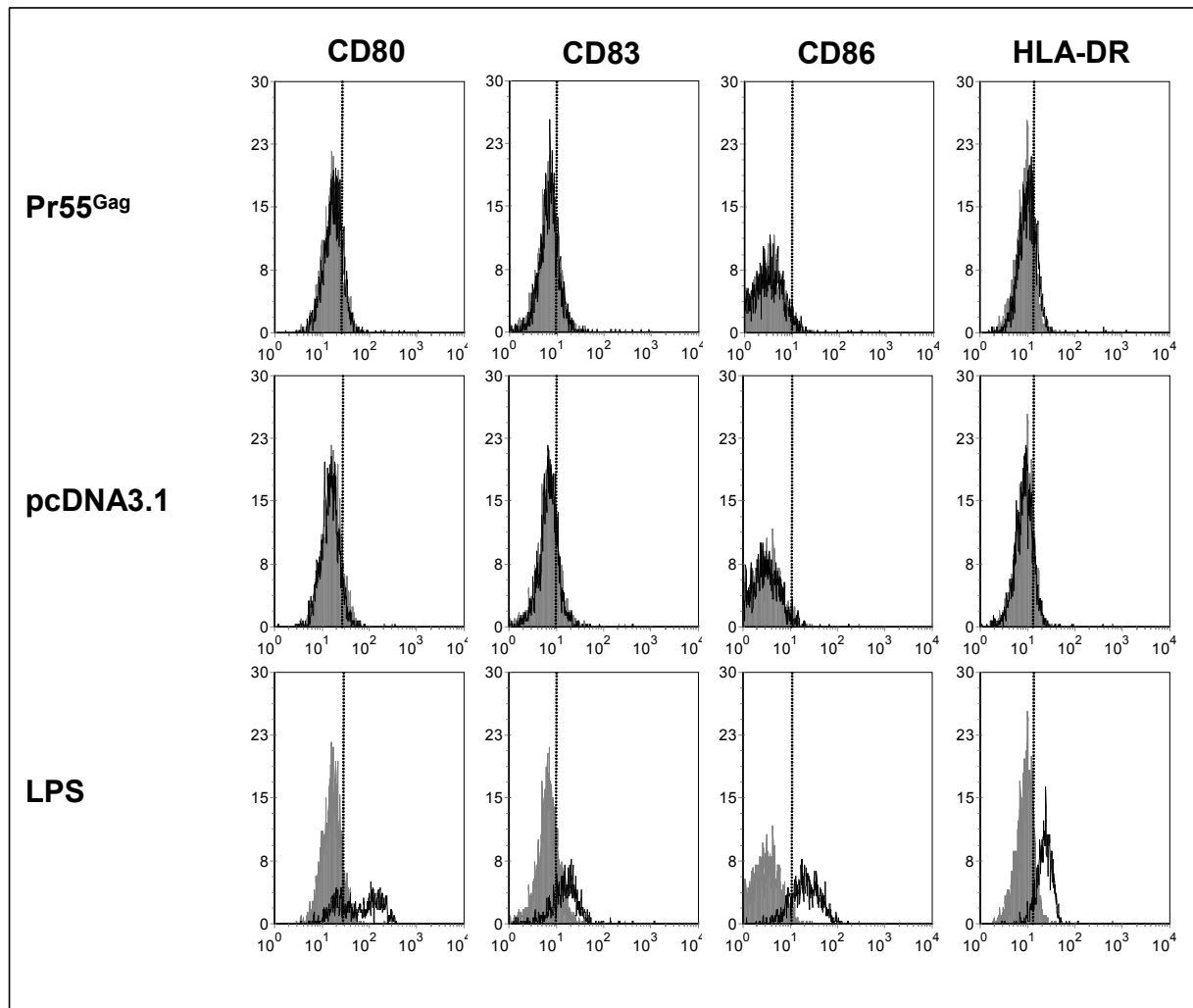


Abb. C.8: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern von MDDC nach Stimulation mit mVLP

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit mVLP (Pr55<sup>Gag</sup> Partikel), Überständen aus mit pcDNA3.1 transfizierten 293T Zellen oder LPS inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweils angegebenen Oberflächenproteine markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: Mediumkontrolle; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

Hierbei zeigte sich, dass die mit Pr55<sup>Gag</sup>-VLP stimulierten MDDC gegenüber der Mediumkontrolle eine leichte Hochregulierung von HLA-DR von 13% auf 25% aufwiesen. Alle anderen Maturationsmarker blieben negativ. Die Proteine aus Überständen von mit pcDNA3.1 transfizierten 293T Zellen hatten keinen stimulatorischen Einfluss auf die dendritischen Zellen.

### C.3.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit Säuger-VLP

Die Überstände der Stimulationsansätze wurden nach der Inkubation mittels ELISA auf sezernierte Zytokine untersucht. Dabei zeigte sich, dass die mVLP die MDDC nur in geringem Maße zur Zytokinproduktion anregen konnten. IFN- $\alpha$  wurde überhaupt nicht sezerniert und blieb auch bei der LPS-Kontrolle negativ. Die Pr55<sup>Gag</sup>-VLP erzeugten eine leichte Steigerung der IL-10- (von 9 pg/ml auf 22 pg/ml) und IL12p70-Sekretion (von 0 pg/ml auf 8 pg/ml). Die mVLP konnten also keine bemerkenswerte Aktivierung der MDDC bewirken.

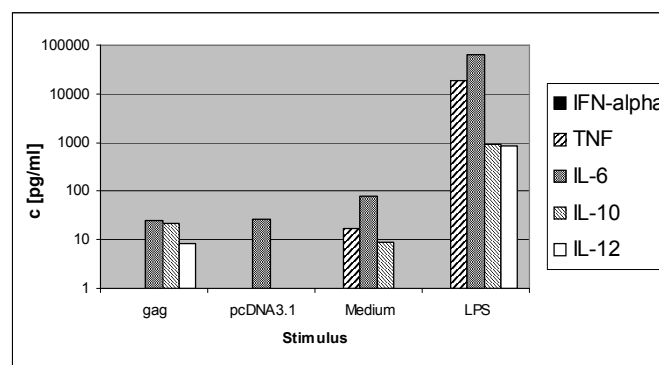


Abb. C.9: Bestimmung der Konzentrationen sezernierter Zytokine mittels ELISA

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit mVLP (Pr55<sup>Gag</sup> Partikel), Überständen aus mit pcDNA3.1 transfizierten 293T Zellen oder LPS inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf sezernierte Zytokine (TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70 und IFN- $\alpha$ ) untersucht. Als Negativkontrolle dienten nur in DC-Medium inkubierte MDDC.

### C.3.2. Stimulation von MDDC mit baculoviralen VLP

Humane immature MDDC wurden mit baculoviralen VLP (bvVLP) stimuliert. Als Kontrolle dienten Proteine aus dem Überstand nicht infizierter High Five<sup>TM</sup> Zellen, die auf die gleiche Weise wie die bvVLP aufgereinigt worden waren, um zu überprüfen, ob mögliche Verunreinigungen durch Insektenzellbestandteile Einfluss auf die Aktivierung der MDDC haben. LPS wurde als Positivkontrolle, nur mit DC-Medium inkubierte Zellen als Negativkontrolle eingesetzt.

**C.3.2.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit baculoviralen VLP**

Nach der Stimulation wurden die MDDC wie unter C.3.1.1. beschrieben mittels FACS analysiert (Abb. C.10), um ihren Maturationsgrad zu bestimmen. Auf diese Weise konnte bei den mit bvVLP stimulierten Zellen eine Hochregulierung der Maturationsmarker CD80 (81%), CD86 (94%) und HLA-DR (89%) auf ähnlich hohe Level wie die der Positivkontrolle festgestellt werden. Mögliche Verunreinigungen durch Bestandteile der High Five<sup>TM</sup> Zellen spielten dabei nur eine untergeordnete Rolle, da sich im Kontrollansatz eine geringere Maturation der MDDC (CD80: 48%, CD86: 39%, HLA-DR: 60%) zeigte. Für die Marker CD83, CD40 und CCR7 konnte weder bei den bvVLP noch bei der High Five<sup>TM</sup> Kontrolle eine wesentliche Hochregulierung gegenüber der Mediumkontrolle festgestellt werden.

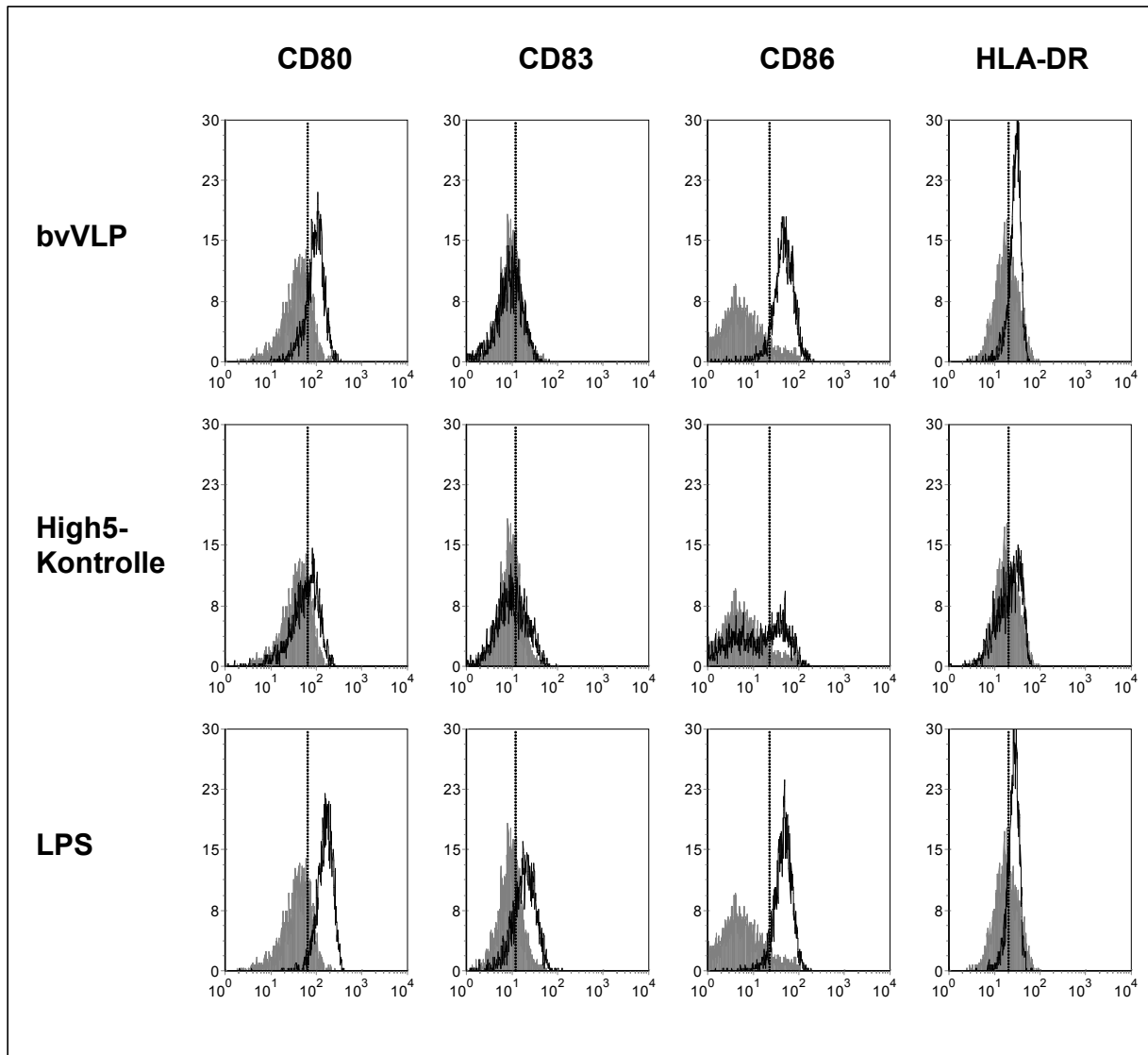


Abb. C.10: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern von MDDC nach Stimulation mit bvVLP

Immature MDDC wurden mit bvVLP, Überständen aus nicht infizierten High Five<sup>TM</sup> Zellen oder LPS inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweils angegebenen Oberflächenproteine markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: Mediumkontrolle; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

### C.3.2.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit baculoviralen VLP

Die Aktivierung der MDDC wurde über die Zytokinkonzentration in den Überständen der Stimulationsansätze bestimmt (Abb. C.11). Die bvVLP bewirkten eine Produktion von IFN- $\alpha$  (158 pg/ml), wohingegen die MDDC, die mit LPS (Positivkontrolle) stimuliert wurden, dieses Zytokin nicht sezernierten. Außerdem konnte durch die Stimulation mit den bvVLP die TNF- (397 pg/ml), IL-6- (>10000 pg/ml), IL-10- (97 pg/ml) und IL-12p70-Produktion (19 pg/ml) gegenüber der Mediumkontrolle (IFN- $\alpha$ : 0 pg/ml, TNF: 0 pg/ml, IL-6: 35 pg/ml, IL-10: 9 pg/ml, IL-12p70: 0 pg/ml) erheblich gesteigert werden.

Auch hier zeigten die Proteine der High Five<sup>TM</sup> Zellen keinen großen Effekt. Für TNF wurde eine Konzentration von 37 pg/ml gemessen, für IL-6 182 pg/ml und für IL-10 27 pg/ml.

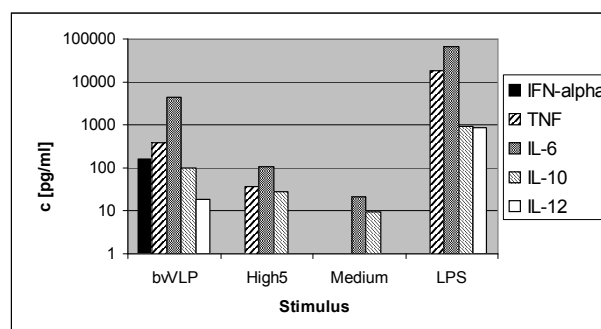


Abb. C.11: Bestimmung der Konzentrationen sezernierter Zytokine mittels ELISA

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit bvVLP, Überständen aus nicht infizierten High Five<sup>TM</sup> Zellen, LPS (Positivkontrolle) oder nur in Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf die Zytokine TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70 und IFN- $\alpha$  untersucht.

### C.3.3. Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen mit baculoviralen VLP

Im folgenden Versuch wurden plasmazytoide dendritische Zellen mit bvVLP inkubiert, um den Effekt baculoviraler VLP (bvVLP) auf diese natürlichen IFN- $\alpha$ -produzierenden Zellen mit dem auf die *ex vivo* generierten Dendriten (MDDC) zu vergleichen.

Dazu wurden pDC mit bvVLP oder Protein aus dem Überstand nicht infizierter High Five<sup>TM</sup> Zellen stimuliert. Außerdem wurden pDC mit CpG ODN A-class oder C-class,



als Positivkontrolle und mit LPS oder nur mit pDC-Medium als Negativkontrollen inkubiert.

Die Aktivierung der pDC durch bvVLP wurde über die IFN- $\alpha$ -Produktion mittels Zytokin-ELISA aus den Überständen der Stimulationsansätze bestimmt (Abb. C.12). Die pDC, die mit bvVLP stimuliert worden waren, produzierten hohe Mengen an IFN- $\alpha$  (643 pg/ml), die mit denen der Positivkontrolle (CpG ODN A: 744 pg/ml; CpG ODN C: 932 pg/ml) vergleichbar waren. Die High Five<sup>TM</sup> Kontrolle bewirkte lediglich eine ca. 6-mal geringere IFN- $\alpha$ -Produktion der pDC (105 pg/ml). Die LPS- und die Mediumkontrolle blieben negativ.

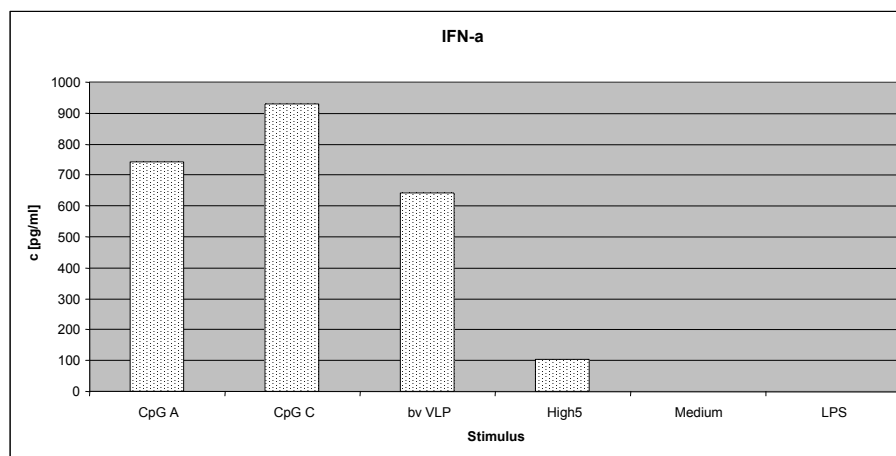


Abb. C.12: Bestimmung der Konzentration an IFN- $\alpha$  mittels ELISA

pDC wurden für 48 Stunden mit CpG ODN A-class oder C-class (Positivkontrolle), bvVLP, Überständen aus nicht infizierten High Five<sup>TM</sup> Zellen, LPS oder nur in pDC-Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf IFN- $\alpha$  untersucht.

## C.4. Reinheitsbestimmung der baculoviralen VLP

### C.4.1. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Im Folgenden wurde untersucht, welche die immunstimulatorische Komponente der baculoviralen VLP (bvVLP) Präparation ist und ob sich außer möglichen Bestandteilen der High Five<sup>TM</sup> Zellen noch andere Verunreinigungen darin finden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Simon Bredl (Bredl, 2005).

Dazu wurde ein Aliquot einer bvVLP Präparation auf ein gefilmtes Kupfergrid übertragen, ein Negative Staining durchgeführt und die Probe anschließend elektronenmikroskopisch betrachtet (Abb. C.13).

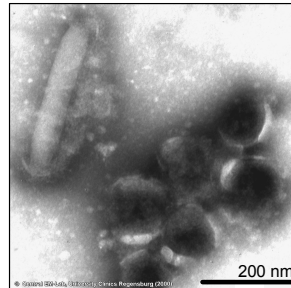


Abb. C13: Elektronenmikroskopische Aufnahme der bvVLP Präparation

Zellkulturüberstände von High Five<sup>TM</sup> Zellen wurden nach Infektion mit Ac-Gag geerntet, durch Ultrazentrifugation über ein 30%-iges Saccharosekissen vorgereinigt und anschließend über einen 10 bis 50%-igen Saccharosegradienten aufgetrennt. Nach der Auftrennung der Fraktionen über ein 12,5%-iges Polyacrylamidgel erfolgte eine Analyse im Westernblot mit dem Gag-spezifischen Antikörper 13/5. Die Fraktion mit dem höchsten Gehalt an Pr55Gag wurde für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendet.

Originalvergrößerung: 25000.

(Vgl. Bredl, 2005)

Die Aufnahmen zeigen, dass die bvVLP Präparation durch intakte Baculoviren verunreinigt ist, was die starke Aktivierung der dendritischen Zellen durch bvVLP im Gegensatz zu den Säuger-VLP (mVLP) erklären könnte.

Aufgrund dieser Kontamination war außerdem unklar, ob das im Westernblot (siehe Abb. C.5 C) detektierte gp64 Bestandteil der bvVLP ist, oder von der Verunreinigung durch die Baculoviren herrührt.

Daher wurde zur genaueren Lokalisation des gp64 Proteins ein Immunogoldlabelling durchgeführt. Die auf den Nickelgrids fixierten Partikel wurden dazu mit einem murinen anti-gp64 Antikörper und anschließend mit einem mit Goldpartikeln gekoppelten anti-Maus Antikörper inkubiert. Die Visualisierung der spezifisch markierten Strukturen erfolgte wiederum mittels Elektronenmikroskopie (Abb. C.14).

Aus den Aufnahmen wurde ersichtlich, dass gp64 nicht nur auf den Baculoviren, sondern auch auf der Oberfläche der bvVLP vorhanden ist.

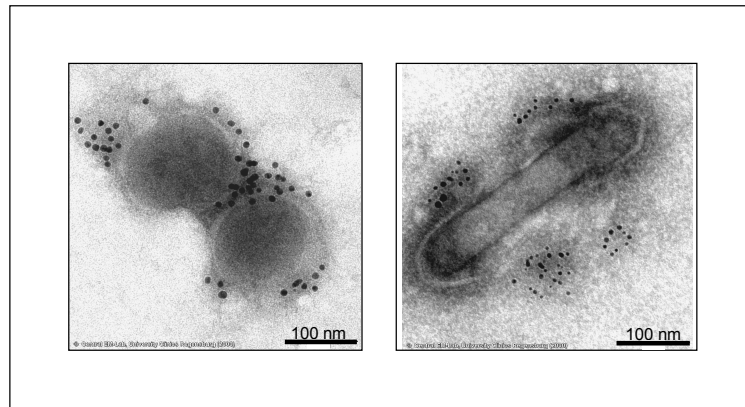


Abb. C.14: Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen der bvVLP Präparation

Für das Immunogoldlabelling wurde die gleiche Fraktion der bvVLP Präparation verwendet, wie unter Abb. C.13 beschrieben. Diese Fraktion wurde an ein Grid adsorbiert und mit einem gp64-spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert. Die gebundenen Antikörper wurden anschließend mit einem anti-Maus IgG-Goldkonjugat markiert und im Elektronenmikroskop untersucht.

Links: Goldmarkierte bvVLP; rechts: goldmarkiertes Baculovirus.

Originalvergrößerung: 40000.

(Vgl. Bredl, 2005)

#### C.4.2. Baculovirus Titerbestimmung

Zur exakten Quantifizierung der Kontamination der baculoviralen VLP (bvVLP) mit Baculoviren wurde der Virustiter in der bvVLP Präparation über ein Verfahren zur Baculovirus Titerbestimmung mittels FACS (Mulvania et al. 2004) bestimmt. Gegenüber dem Plaque Assay, welcher der Goldstandard bei der Baculovirus Titerbestimmung ist, hat diese Methode den Vorteil, dass sie schneller und einfacher durchzuführen ist und sich der Titer genauer bestimmen lässt.

Somit konnte ein Titer von  $1 \times 10^9$  Baculoviren/ml in der bvVLP Präparation nachgewiesen werden (Tab. C.1).

Verdün- nung	Well 1	Well 2	MW	Korrektur	Verdün- nungs- faktor	Korrektur x Ver- dünnungsfaktor	Mittel x $2 \times 10^6$ (Zellzahl)
Stock	84,22	79,26	81,74				
1:10	36,8	39,55	38,175	0,467029606	10	4,670296061	
1:100	25,36	44,07	34,714	0,424700269	100	42,47002691	
1:1000	23,59	20,07	21,83	0,267066308	1000	267,0663078	
1:10000	14,5	16,45	15,475	0,189319794	10000	1893,197945	
<b>Mittel</b>						551,8511439	
<b>Titer</b>							<b>1103702288</b>

Tab. C.1: Baculovirus Titerberechnung

## C.5. Immunstimulatorische Eigenschaften von Wildtyp Baculoviren

### C.5.1. Stimulation von MDDC mit Wildtyp Baculoviren

Da eindeutig gezeigt werden konnte, dass die baculoviralen VLP (bvVLP) durch Baculoviren verunreinigt waren, wurde in den folgenden Versuchen überprüft, ob diese Einfluss auf die Stimulation der Immunzellen haben.

Dazu wurden  $5 \times 10^5$  MDDC mit  $10 \mu\text{g}$  der Wildtyp Baculovirussuspension (Titer:  $1 \times 10^9$  Viren/ml) inkubiert, die auf die gleiche Weise über ein Saccharosekissen aufgereinigt worden waren wie die bvVLP. Als Positivkontrolle wurden MDDC mit LPS, als Negativkontrolle nur mit DC-Medium inkubiert.

Anschließend wurde die Maturation der MDDC über die Expression bestimmter Oberflächenmarker mittels FACS und die Aktivierung der Zellen über die Zytokinproduktion mittels ELISA gemessen.

#### C.5.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren

Die Maturation der mit Wildtyp Baculoviren stimulierten MDDC wurde über die Hochregulierung der Oberflächenproteine CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD40 und CCR7 mittels FACS Analyse ausgelesen (Abb. C.15).

Dabei zeigte sich, dass die Baculoviren die MDDC zu einer Expression von CD80, CD86 und HLA-DR anregten. Diese Marker wurden etwa gleich stark wie bei der Positivkontrolle hochreguliert, was die immunstimulatorischen Eigenschaften der Baculoviren beweist. Die kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD40 sowie der

Chemokinrezeptor CCR7 wurden gegenüber der Mediumkontrolle nicht wesentlich stärker exprimiert.

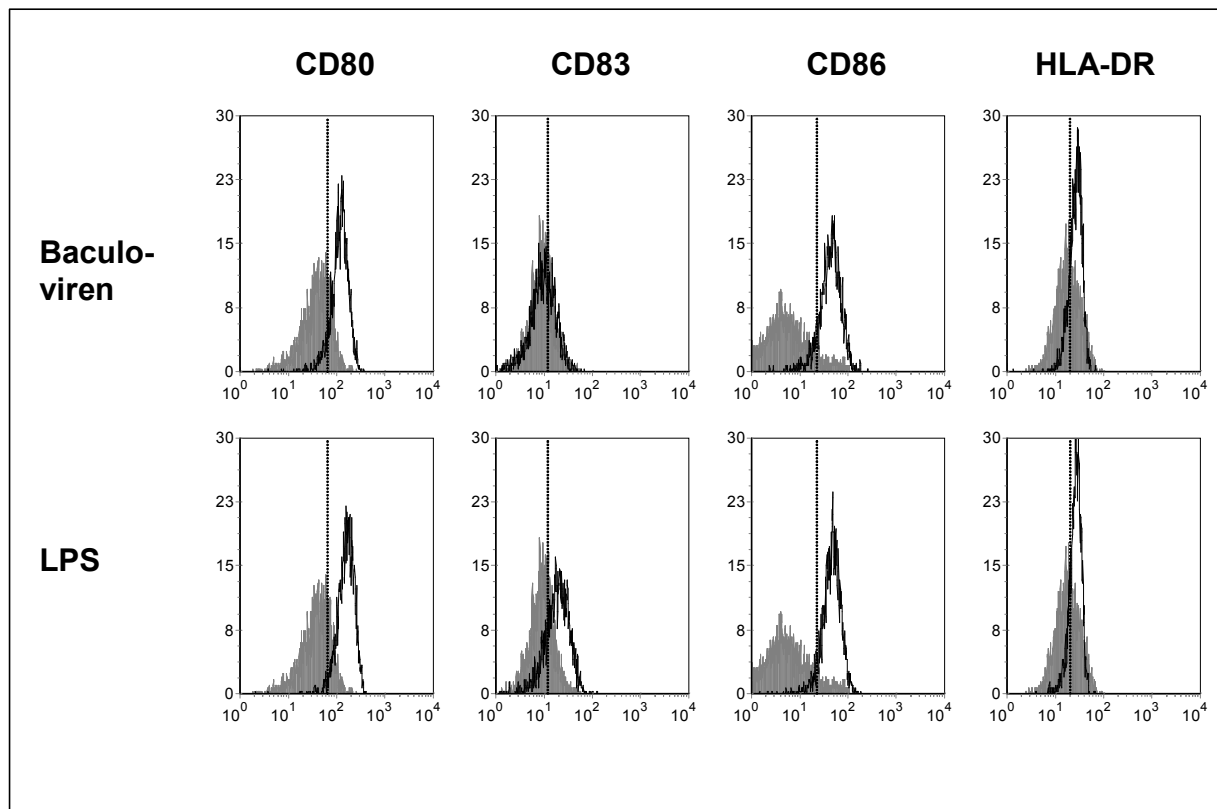


Abb. C.15: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern von MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit Wildtyp Baculoviren oder LPS inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweils angegebenen Oberflächenproteine markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: Mediumkontrolle; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

#### C.5.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren

Als zweite Komponente der Immunzell-Aktivierung wurde auch die Zytokin-Produktion der MDDC nach Stimulation mit Wildtyp Baculoviren überprüft. Dazu wurden die Überstände aus den Stimulationsansätzen auf IFN- $\alpha$ , TNF, IL-6, IL-10 und IL-12p70 mittels ELISA untersucht (Abb. C.16).

Die Baculoviren regten die MDDC zur Produktion aller gemessenen Zytokine an. Auffällig war auch hier die IFN- $\alpha$  Sekretion (271 pg/ml), welche durch die Viren, aber

nicht durch LPS hervorgerufen wurde. Auch die Produktion der übrigen Zytokine (TNF: 89 pg/ml, IL-6: 10416 pg/ml, IL-10: 52 pg/ml und IL-12p70: 6 pg/ml) zeigte ein ähnliches Muster wie die durch die bvVLP bewirkte Zytokin-Produktion.

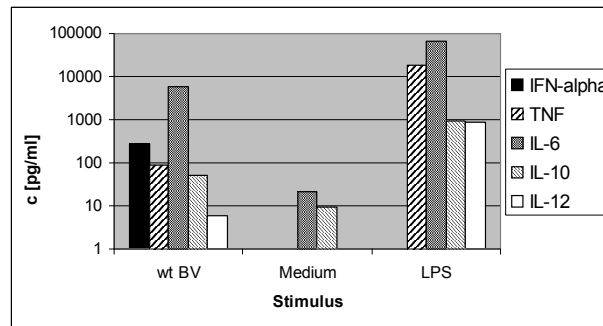


Abb. C.16: Bestimmung der Konzentrationen sezernierter Zytokine mittels ELISA

Immature MDCC wurden mit Wildtyp Baculoviren, LPS (Positivkontrolle) oder nur in DC-Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70 und IFN- $\alpha$  untersucht.

### C.5.2. Stimulation von MDCC mit verschiedenen Titern an Wildtyp Baculoviren

Im Folgenden wurden MDCC mit verschiedenen Titern an Wildtyp Baculoviren stimuliert.

Dazu wurden zunächst 10  $\mu$ g der Virus-Suspension (Titer:  $1 \times 10^9$  Viren/ml) eingesetzt, was einer Zahl von  $6,7 \times 10^6$  Viren entspricht. Anschließend erfolgte die Anfertigung einer Verdünnungsreihe von  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^0$  Viren. Schließlich wurden MDCC mit den Virus-Verdünnungen stimuliert. Als Negativkontrollen wurden die Zellen mit PBS oder nur in DC-Medium inkubiert. LPS diente als Positivkontrolle. Nach der Stimulation erfolgte die Analyse der Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 mittels FACS (Abb. C.17). Bei den Werten für CD80 zeigte sich kein Unterschied zwischen der Stimulation mit  $6,7 \times 10^6$  Viren (unverdünnte Virus-suspension) oder  $1 \times 10^6$  Viren. Mit weiter abnehmender Viruskonzentration nahm auch die Expression der Oberflächenmarker ab. Ab einer Verdünnung von  $1 \times 10^4$  Viren lagen die Werte nicht mehr über dem Wert der Mediumkontrolle.

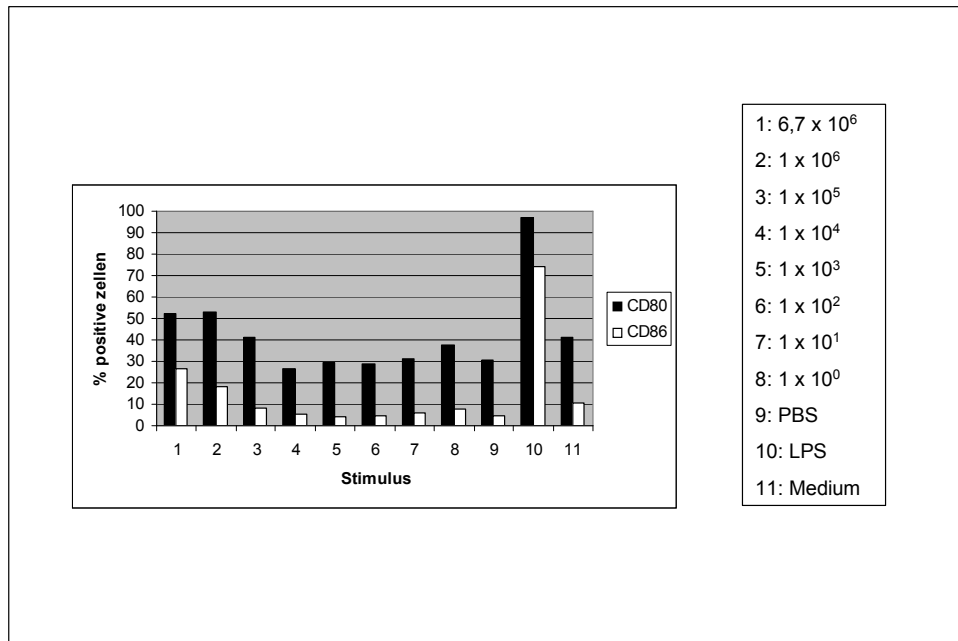


Abb. C.17: FACS-Analyse der Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 auf MDDC nach Stimulation mit unterschiedlichen Titern an Baculoviren

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit den angegebenen Titern an Wildtyp Baculoviren, LPS (Positivkontrolle) oder nur in DC-Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD80 und CD86 markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Wildtyp Baculoviren MDDC zur Maturation bringen und dass diese Reifung von der Viruskonzentration abhängig ist.

## C.6. Untersuchung baculoviraler Bestandteile auf ihre immunstimulatorische Wirkung

In Mäusen und murinen Zelllinien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die baculovirale DNA das angeborene Immunsystem über den TLR-9 Weg aktiviert, wobei für die Aufnahme des Virus und die Freisetzung der DNA in TLR-9 exprimierende Zellkompartimente das Hüllprotein gp64 notwendig ist (Abe et al. 2005).

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss das Hüllprotein gp64 und die baculovirale DNA auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC haben. Hierzu wurden zum einen Säuger-VLP mit dem gp64 Protein pseudotypisiert (siehe C.2) und zur Stimulation von MDDC eingesetzt. Zum anderen wurde DNA aus

Wildtyp Baculoviren isoliert und auf ihre immunstimulatorische Eigenschaften überprüft.

### **C.6.1. Stimulation von MDDC mit Säuger-VLP mit baculoviralem Hüllprotein**

Humane immature MDDC wurden mit Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup>-VLP stimuliert. Proteine aus Überständen von mit *pcDNA3.1* transfizierten 293T Zellen, die in gleicher Weise wie die VLP aufgereinigt worden waren, wurden als Kontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente LPS und als Negativkontrolle wurden MDDC eingesetzt, die nur in DC-Medium inkubiert wurden.

#### **C.6.1.1. Maturation von MDDC nach Stimulation mit pseudotypisierten Säuger-VLP**

Der Maturationsgrad der MDDC wurde mittels FACS-Analyse bestimmt (Abb. C.18). Hierbei zeigte sich, dass die mit Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup>-VLP stimulierten MDDC gegenüber der Mediumkontrolle außer einer leichten Hochregulierung von HLA-DR von 13% auf 23% keine Aktivierung aufwiesen. Alle anderen Marker blieben negativ. Die Proteine aus Überständen von mit *pcDNA3.1* transfizierten 293T Zellen hatten keinen stimulatorischen Einfluss auf die dendritischen Zellen.



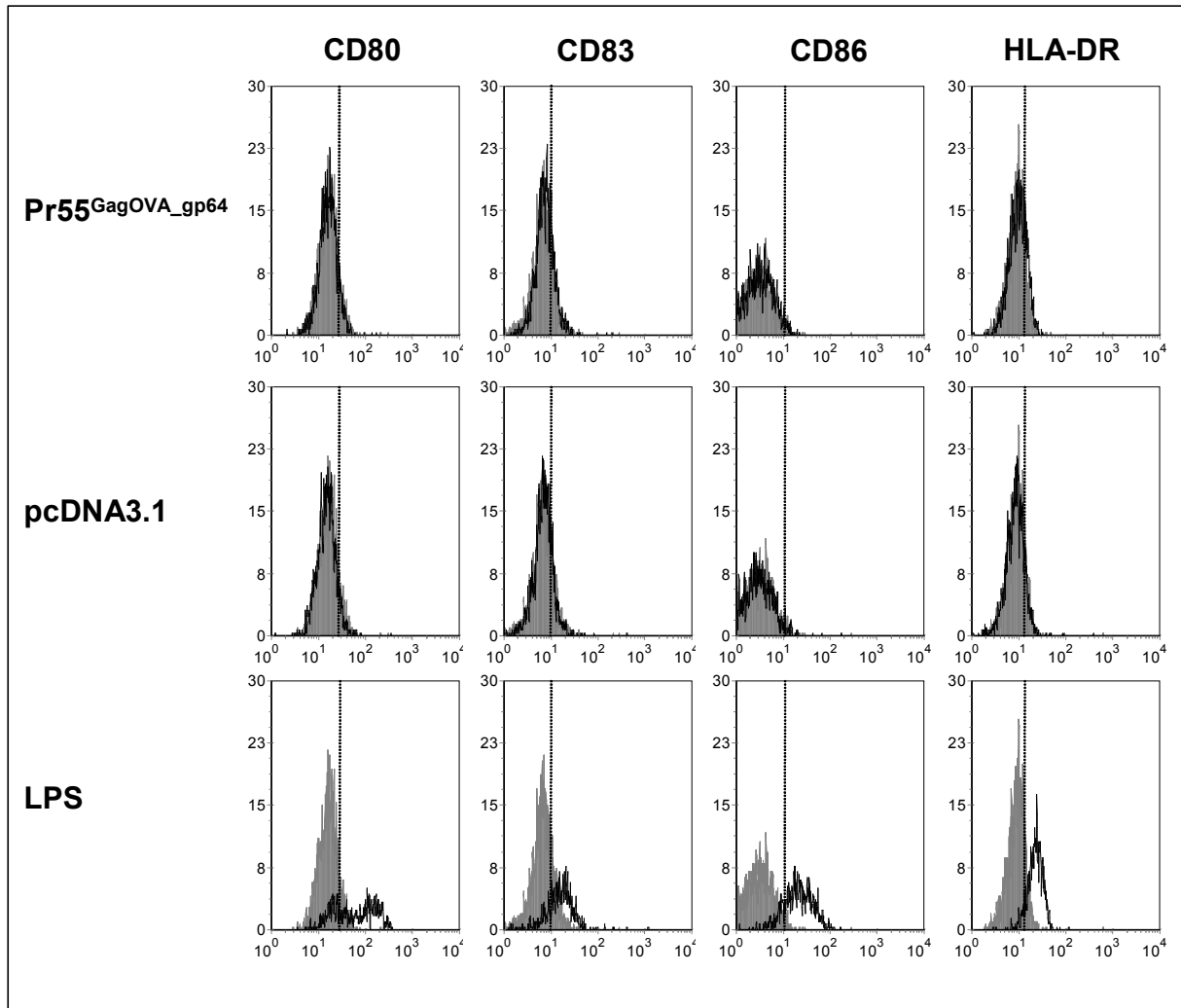


Abb. C.18: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern von MDDC nach Stimulation mit pseudotypisierten mVLP

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit mVLP (Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup> Partikel), Überständen aus mit pcDNA3.1 transfizierten 293T Zellen oder LPS inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweils angegebenen Oberflächenproteine markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: Mediumkontrolle; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

### C.6.1.2. Aktivierung von MDDC nach Stimulation mit pseudotypisierten Säuger-VLP

Die Aktivierung der MDDC wurde mittels Zytokin-ELISA bestimmt (Abb. C.19). Hier ergab sich bei den mit Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup>-VLP stimulierten Zellen für IL-6 ein Wert von 15,3 pg/ml und für IL-10 13,7 pg/ml. Gegenüber der Mediumkontrolle (TNF: 16,9 pg/ml, IL-6: 78,5 pg/ml, IL-10: 8,7 pg/ml) konnte somit keine Steigerung der Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Die Kontrolle mit pcDNA3.1 ergab ebenfalls keine vermehrte Sekretion von Zytokinen.

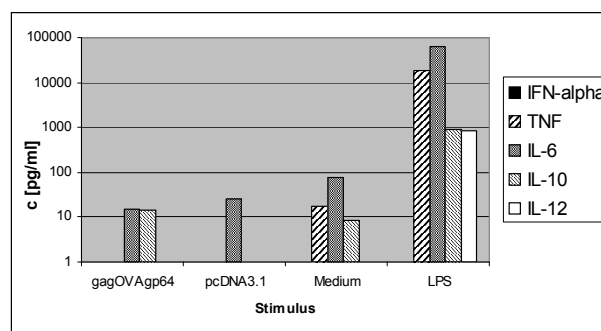


Abb. C.19: Bestimmung der Konzentrationen sezernierter Zytokine mittels ELISA

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit pseudotypisierten mVLP (Pr55<sup>GagOVA\_gp64</sup> Partikel), Überständen aus mit pcDNA3.1 transfizierten 293T Zellen oder LPS inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA auf sezernierte Zytokine (TNF, IL-6, IL-10, IL-12p70 und IFN-α) untersucht. Als Negativkontrolle dienten nur in DC-Medium inkubierte MDDC.

### C.6.2. Isolierung und Analyse von DNA aus Wildtyp Baculoviren

Nach der Isolierung und Aufreinigung von baculoviraler DNA aus Wildtyp Baculoviren wurde diese zur weiteren Analyse mit Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente mittels Elektrophorese über ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetrennt. Die detektierten Banden (Abb. C.20, Spur 2) entsprachen in ihrer Größe den zu erwartenden Fragmenten von 500bp, 866bp, 2116bp, 6604bp, 7193bp, 7258bp, 8877bp, 12820bp, 16580bp, 21950bp, 23877bp und 25253bp.

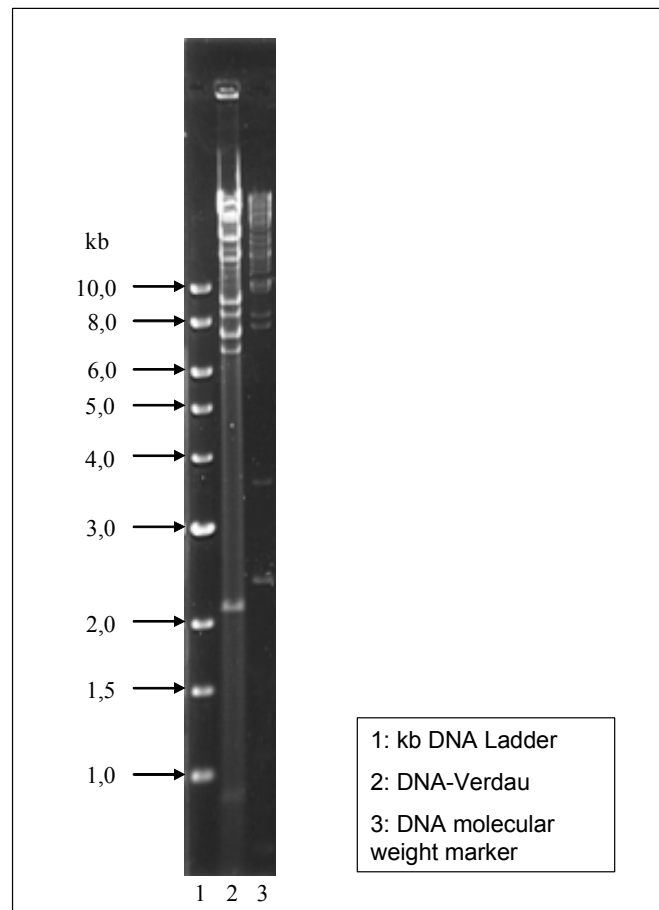


Abb. C.20: Kontrollverdau der aufgereinigten baculoviralen DNA

Die aufgereinigte DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Xma I und Rsr II (New England Biolabs GmbH) eine Stunde lang bei 37°C verdaut. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Fragmente über ein 0,8%-iges Agarosegel mittels Elektrophorese.

Weiterhin sollte das gp64-Gen, welches für das baculovirale Hüllprotein gp64 kodiert, mittels PCR nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle diente der Plasmidvektor *pcDNA 3.1 gp64* (Abb. C.21, Spur 4), als Negativkontrolle wurde Wasser statt DNA in den PCR-Ansatz eingesetzt (Abb. C.21, Spur 3). Nach der Amplifikation wurden die Proben auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt.

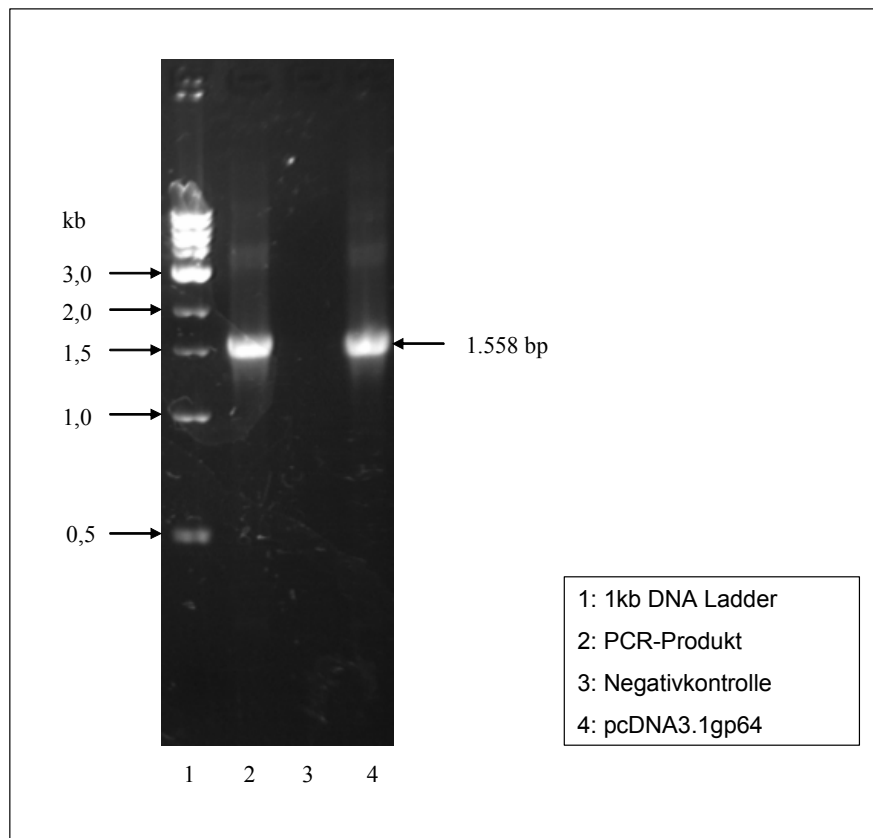


Abb. C.21: PCR-Analyse der aufgereinigten baculoviralen DNA

Die aufgereinigte baculovirale DNA wurde mittels PCR auf das gp64-Gen untersucht. Als Primer wurden die Oligonukleotide gp64-KOZAK-forward und gp64 reverse eingesetzt. Der Plasmidvektor pcDNA3.1gp64 (Spur 4) diente als Positivkontrolle, Wasser (Spur 3) als Negativkontrolle. Anschließend wurden je 5 µl PCR-Produkt auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und mittels Elektrophorese in die einzelnen Fragmente aufgetrennt.

Es konnte eine deutliche Bande entsprechend der Größe des gp64-Gens von 1558bp nachgewiesen werden (Abb. C.21, Spur 2).

Durch den Kontrollverdau mit Restriktionsenzymen und den Nachweis des gp64-Gens konnte bewiesen werden, dass es sich bei der isolierten Nukleinsäure um baculovirale DNA handelt und nicht um DNA aus Insektenzellen oder andere Verunreinigungen.

### C.6.3. Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA

Um zu überprüfen ob die baculovirale DNA eine Rolle bei der immunstimulatorischen Wirkung der Baculoviren auf die humanen dendritischen Zellen spielt, wurden  $5 \times 10^5$  MDDC mit 2 µg DNA stimuliert. Außerdem sollte untersucht werden ob zur

Maturation und Aktivierung dieser Immunzellen durch die baculovirale DNA Substanzen notwendig sind, welche die Aufnahme der DNA in die Zellen erleichtern. Dafür wurde FuGENE® HD Transfection Reagent gewählt, da diese Substanz wenig zytotoxisch ist.

Weiterhin ist bekannt, dass so genannte CpG-Motive in viralen Nukleinsäuren für die Aktivierung des Immunsystems über den Toll-Like-Receptor-9 und vermutlich auch über TLR unabhängige Wege verantwortlich sind (Wagner et al., 2006). Um diese CpG-Motive in der baculoviralen DNA zu zerstören, wurde die DNA für einen Kontrollansatz mit der Nuklease Omnicleave verdaut. Diese Nuklease schneidet DNA unspezifisch bis auf Dinukleotidebene.

Für diesen Versuch wurden MDDC mit baculoviraler DNA oder verdauter baculoviraler DNA jeweils mit oder ohne FuGENE® stimuliert. Als eine Kontrolle wurde Wasser statt DNA mit der Nuklease versetzt und genauso behandelt wie der DNA-Verdau. Dieser Kontrollansatz wurde ebenfalls mit oder ohne FuGENE® zu den MDDC gegeben. Als Positivkontrolle wurde LPS eingesetzt und als Negativkontrolle dienten MDDC, die nur in DC-Medium kultiviert wurden.

Anschließend wurde die Maturation der MDDC über die Expression bestimmter Oberflächenmarker mittels FACS und die Aktivierung der Zellen über die Zytokinproduktion mittels ELISA gemessen.

#### **C.6.3.1. Maturation der MDDC nach Stimulation mit baculoviraler DNA**

Um die Maturation der MDDC, die mit baculoviraler DNA stimuliert wurden, zu bestimmen, wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, CD86 und CD40, des MHC Klasse II Moleküls HLA-DR und des Chemokinrezeptors CCR7 mittels FACS-Analyse gemessen (Abb. C.22).

Bei der Auswertung der Marker CD80, CD86 und HLA-DR zeigte sich eine sehr deutliche Hochregulierung bei den MDDC, die mit der baculoviralen DNA zusammen mit FuGENE® stimuliert worden waren. Für CD80 und CD86 war das Ergebnis vergleichbar mit dem der Positivkontrolle, für HLA-DR lag es sogar darüber. Auch die Expression von CD83 und CD40 wurde durch die DNA mit FuGENE® leicht hochreguliert.

Die DNA ohne FuGENE<sup>®</sup>, die verdaute DNA sowie die Nuklease alleine konnten die MDDC nicht zur Hochregulierung der Maturationsmarker anregen. Auch FuGENE<sup>®</sup> alleine hatte keinen Einfluss auf die Maturation der Dendriten.

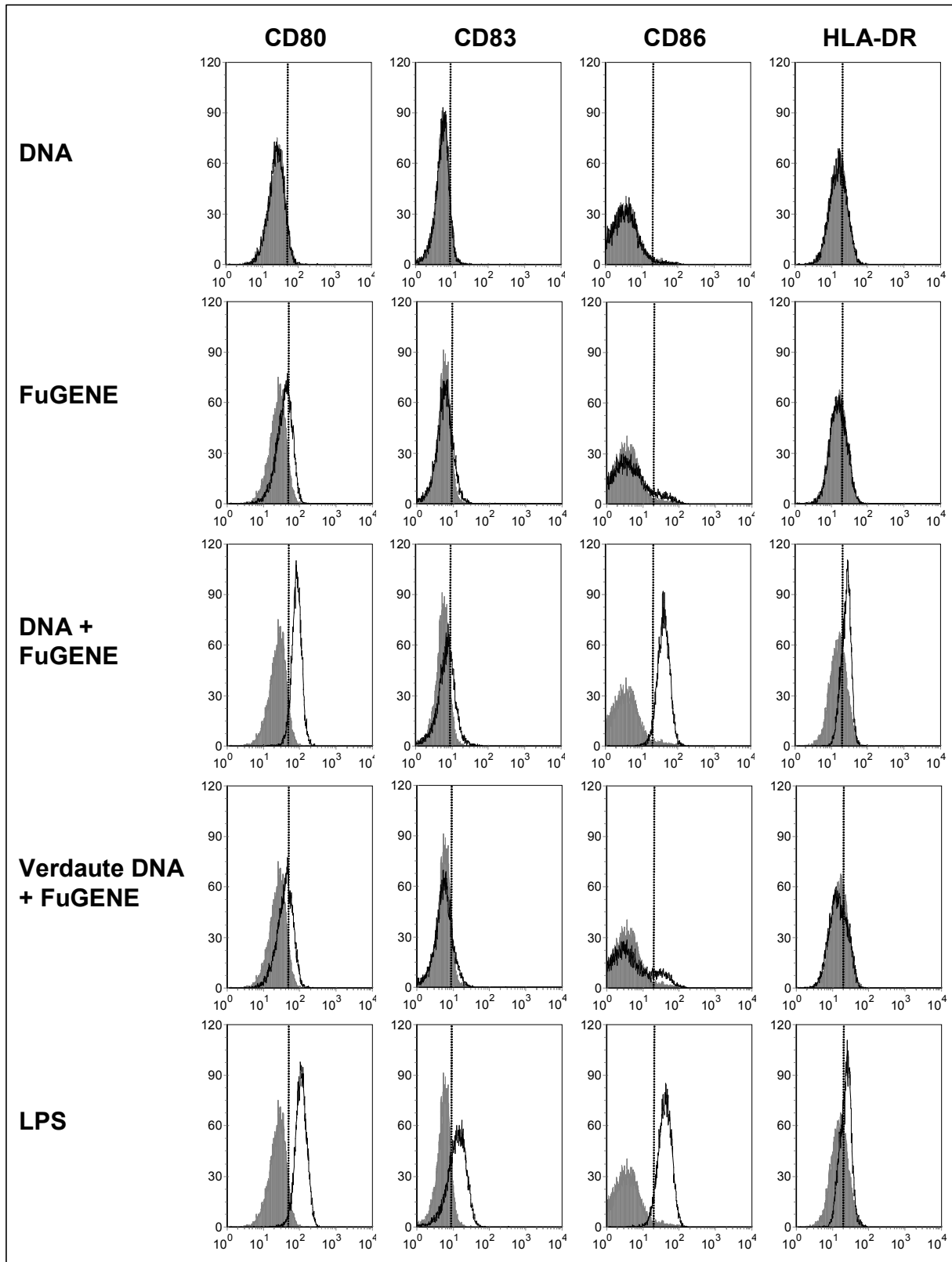


Abb. C.22: FACS-Analyse der Expression von Oberflächenmarkern von MDDC nach Stimulation mit baculoviraler DNA

Immature MDDC wurden für 48 Stunden mit baculoviraler DNA zusammen mit FuGENE®, baculoviraler DNA ohne FuGENE®, FuGENE® alleine, verdauter baculoviraler DNA zusammen mit FuGENE®, LPS (Positivkontrolle) oder nur in DC-Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Nach dem

Ernten der Zellen wurden sie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die jeweils angegebenen Oberflächenproteine markiert. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: Mediumkontrolle; schwarze Kurve: mit Antikörper gegen den angegebenen Oberflächenmarker gefärbte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

### C.6.3.2. Aktivierung der MDDC nach Stimulation mit baculoviraler DNA

Anschließend wurde die Aktivierung der MDDC bezüglich der Zytokinproduktion durch Stimulation mit baculoviraler DNA bestimmt. Dazu wurden die Konzentrationen der Zytokine IFN- $\alpha$ , TNF und IL-6 in den Überständen der Stimulationsansätze mittels ELISA gemessen (Abb. C.23).

Die baculovirale DNA regte die MDDC nur zusammen mit FuGENE<sup>®</sup> zur Produktion aller gemessenen Zytokine an (IFN- $\alpha$ : 3556 pg/ml; TNF: 1095 pg/ml; IL-6: 2373 pg/ml). Dagegen bewirkte die DNA alleine sowie auch die verdaute DNA (mit oder ohne FuGENE<sup>®</sup>) oder die Nuklease keinerlei Zytokinproduktion. Auch FuGENE<sup>®</sup> alleine hatte außer einer leichten TNF-Sekretion von 6 pg/ml keinen Einfluss auf die Aktivierung der MDDC. Auffallend war auch hier, dass die Positivkontrolle, LPS, die MDDC nicht zur Produktion von IFN- $\alpha$  anregte, jedoch eine sehr hohe Produktion von IL-6 (37931 pg/ml) und TNF (7253 pg/ml) bewirkte.

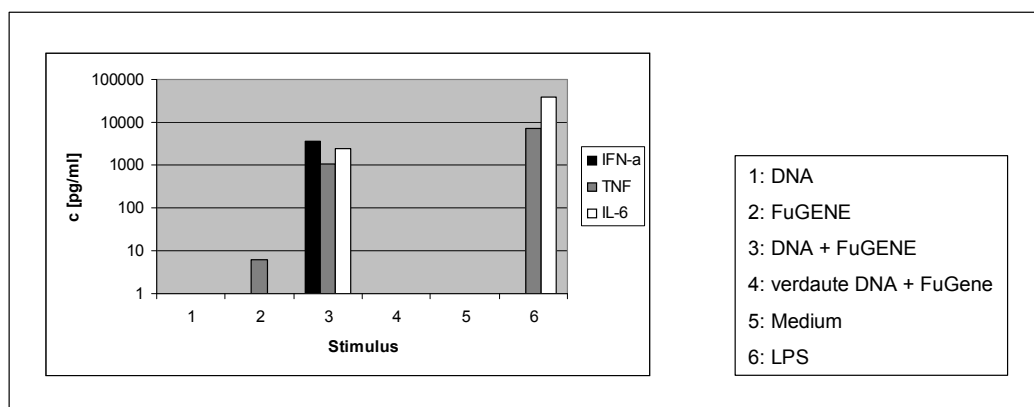


Abb. C.23: Bestimmung der Konzentrationen sezernierter Zytokine mittels ELISA

Immature MDDC wurden mit baculoviraler DNA zusammen mit FuGENE<sup>®</sup>, baculoviraler DNA ohne FuGENE<sup>®</sup>, FuGENE<sup>®</sup> alleine, verdauter baculoviraler DNA zusammen mit FuGENE<sup>®</sup>, LPS (Positivkontrolle) oder nur in DC-Medium (Negativkontrolle) inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf die Zytokine TNF, IL-6 und IFN- $\alpha$  untersucht.



## C.7. Untersuchung der Aufnahme von VLP durch MDDC

### C.7.1. Aufnahme von CFDA gelabelten VLP durch MDDC

Um die Aufnahme der unterschiedlichen VLP durch die MDDC besser verfolgen zu können, wurden die VLP mit CFDA SE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) angefärbt. CFDA SE reagiert unspezifisch mit Aminogruppen und fluoresziert erst in der Zelle, nachdem seine Acetatreste von intrazellulären Esterasen abgespaltet worden sind. Wenn also die MDDC die gelabelten VLP aufgenommen haben, wird der Farbstoff aktiviert und die Zellen leuchten im UV-Licht grün. Somit kann man feststellen, ob die Partikel ins Zellinnere aufgenommen werden. Außerdem ist es möglich mittels FACS-Analyse die Zahl der fluoreszierenden Zellen zu bestimmen.

MDDC wurden mit CFDA SE-markierten, baculoviralen VLP (bvVLP) oder Säuger-VLP (mVLP) inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen mit DAPI, einem Farbstoff der sich in DNA einlagert und somit Zellkerne markiert, gefärbt und zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Der Rest der Zellen wurde mittels FACS analysiert (Abb. C.24).

Bei den MDDC, die mit den mVLP Pr55<sup>Gag</sup> stimuliert worden waren, ließ sich nach 2 Stunden mikroskopisch noch keine Aufnahme der Partikel feststellen. Auch im FACS wurden nur vereinzelt fluoreszierende Zellen detektiert. Nach 24 Stunden konnte man einzelne Zellen sehen, die Partikel aufgenommen hatten und im FACS wurden 14,6% der Zellen als positiv für CFDA erkannt.

Die MDDC, welche mit den mVLP Pr55<sup>GagOva\_gp64</sup> stimuliert worden waren, fluoreszierten bereits nach 2 Stunden, was auch in der FACS-Analyse bestätigt werden konnte (42% positive Zellen). Nach 24 Stunden wurden im FACS 78,1% CFDA positive Zellen detektiert und im Fluoreszenzmikroskop konnten jetzt viele grün leuchtende Zellen entdeckt werden.

Die meisten fluoreszierenden MDDC konnten jedoch nach Stimulation mit den bvVLP festgestellt werden. Nach 2 Stunden waren in der FACS-Analyse bereits 95,5% der Zellen positiv für CFDA und nach 24 Stunden waren es 99,6%. Auch mikroskopisch wurden hier die meisten fluoreszierenden Zellen gesehen.

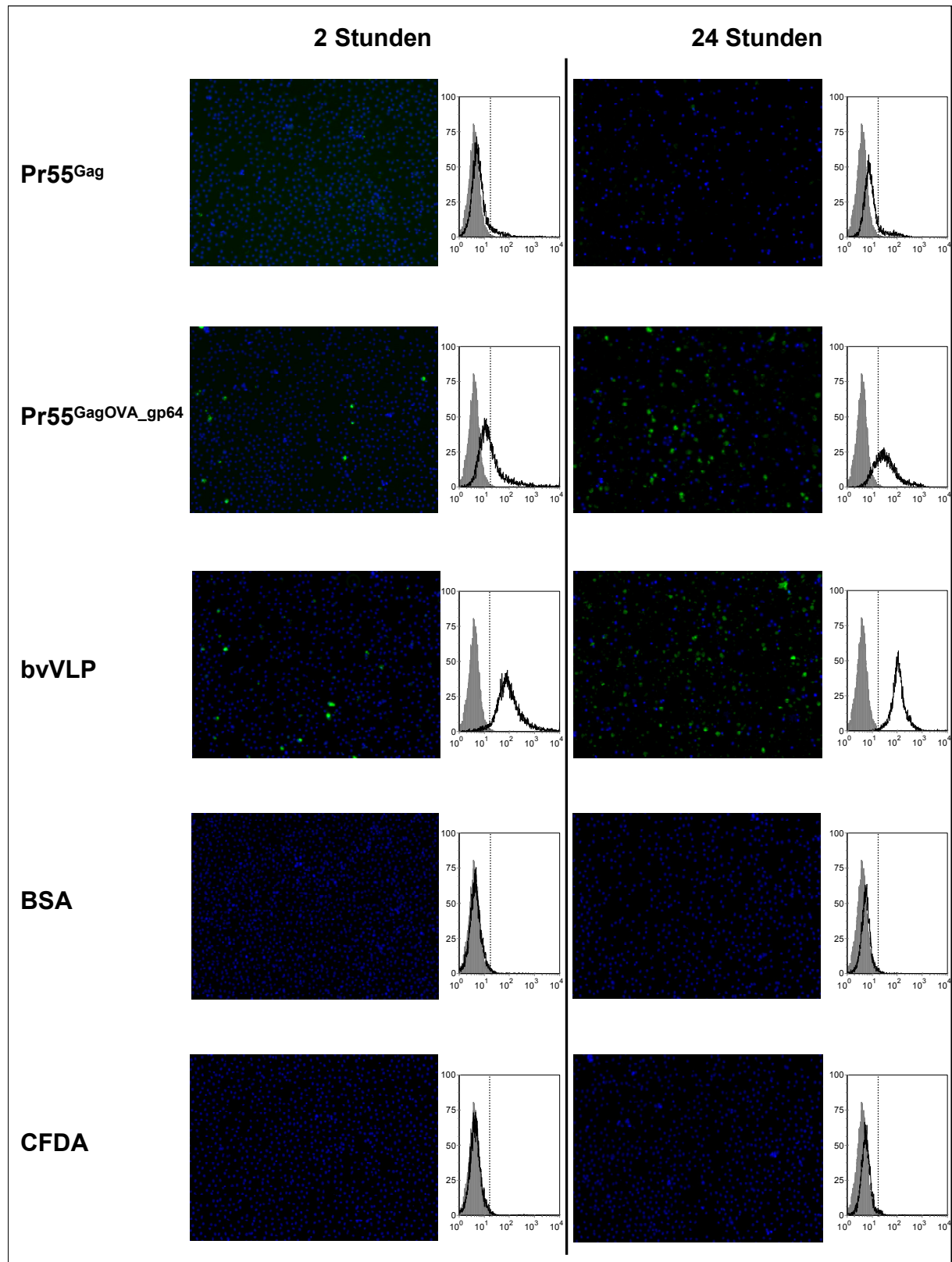


Abb. C.24: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und FACS-Analyse der Aufnahme von VLP durch MDDC

Immature MDDC wurden für 2 oder 24 Stunden mit CFDA SE-gelabelten VLP (mVLP und bvVLP) inkubiert. Nach dem Ernten der Zellen wurde ein Teil mit DAPI gefärbt und zur Fluoreszenz-

mikroskopie verwendet. MDDC, die Partikel aufgenommen haben leuchten grün. Der Rest der Zellen wurde durchflusszytometrisch analysiert.

FACS-Histogramme: Abszisse: Intensität der Fluoreszenz; Ordinate: Zellzahl; grau schraffierte Kurve: 0 Stunden-Wert; schwarze Kurve: mit gelabelten VLP inkubierte Zellen; gestrichelte Linie: gesetztes Gate.

### C.7.2. Aufnahme von baculoviralen VLP durch MDDC (elektronenmikroskopische Bilder)

Die Aufnahme von bvVLP durch die MDDC wurde zusätzlich elektronenmikroskopisch verfolgt. Mit diesen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob aus der Präparation nur die Baculoviren, nur die bvVLP oder beide Bestandteile in die Zelle gelangen und auf welchem Weg dies geschieht.

Dazu wurden MDDC mit bvVLP stimuliert und nach 30 Minuten, 1,5 Stunden oder 3 Stunden elektronenmikroskopisch betrachtet.

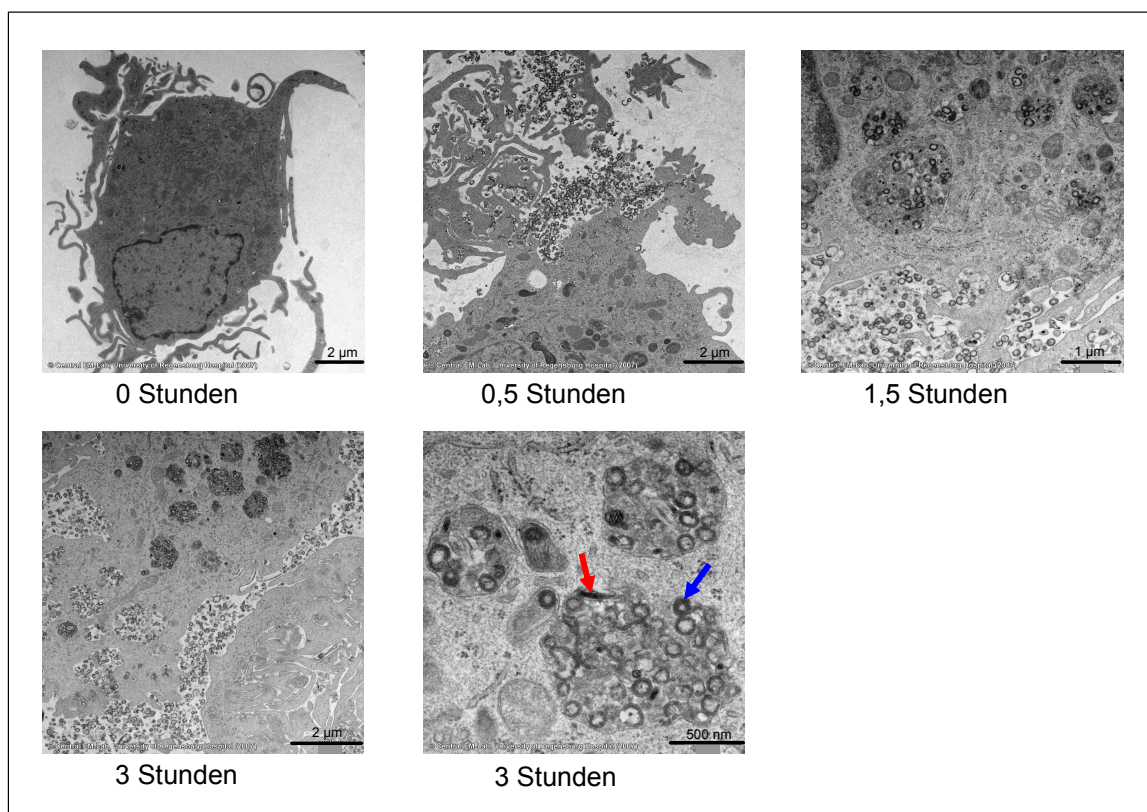


Abb. C.25: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Aufnahme von bvVLP durch MDDC  
Immature MDDC wurden mit bvVLP für 0,5, 1,5 oder 3,0 Stunden inkubiert und nach dem Ernten fixiert. Anschließend wurden die Zellen für die Elektronenmikroskopie aufbereitet.

Roter Pfeil: Baculovirus; blauer Pfeil: bvVLP.

Die Aufnahme zum Zeitpunkt 0 Stunden (Abb. C.25) zeigt eine immature dendritische Zelle (MDDC) mit ihren vielen, teils sehr langen Ausläufern. Auf dem Bild nach 30 Minuten ist eine Zelle zu erkennen, die mit diesen Zellausläufern die bvVLP tentakelartig umschließt. Nach 1,5 Stunden sieht man, wie die Aufnahme der Partikel ins Zellinnere begonnen hat. Durch Einstülpung der Zellmembran (Abb. C.25, 1,5 Stunden, unten im Bild) werden die bvVLP in Endozytosevesikel eingeschlossen. Weiter oben im Bild befinden sich Partikel in membranumschlossenen Vesikeln, bei denen es sich wahrscheinlich um Endosomen (Abb. C.25, 1,5 Stunden, Mitte links und oben im Bild) handelt. Auch nach 3 Stunden kann man dies weiter verfolgen. Es befinden sich immer noch viele Partikel außerhalb der Zellen oder in Endosomen im Zellinneren. Die Vergrößerung des Bildes nach 3 Stunden lässt erkennen, dass sowohl Baculoviren (roter Pfeil) als auch VLP (blauer Pfeil) aufgenommen wurden.

## D. Diskussion

### D.1. Einfluss von HIV Pr55<sup>Gag</sup> VLP auf das angeborene Immunsystem

Pr55<sup>Gag</sup> virusähnliche Partikel (*virus like particles* (VLP)) erfüllen wichtige Anforderungen an eine HIV Vakzine. Sie gewähren nicht nur einen hohen Sicherheitsstandard, da sie nicht infektiös sind und nicht replizieren, sondern lösen auch starke humorale und zelluläre Immunantworten in Mäusen und Primaten aus (Wagner et al. 1994, Paliard et al. 2000). Hierzu ist die Aktivierung des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise die Anregung von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells* (APC)) zur Expression von kostimulatorischen Molekülen und Zytokinen eine wichtige Voraussetzung, um T-Zell Antworten zu induzieren.

Verschiedene Faktoren wie Zytokine und eine große Anzahl an pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*pathogen associated molecular patterns* (PAMPs)), wie z.B. Nukleinsäuren (vor allem unmethylierte CpG-haltige Nukleinsäuren aus Bakterien- oder Insektenzellen), Lipopolysaccharide (LPS) und andere, werden vom angeborenen Immunsystem als Alarmsignale erkannt und führen zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen von unreifen zu aktivierten APC.

Pr55<sup>Gag</sup> VLP scheinen verschiedene Komponenten zu enthalten, die als solche Alarmsignale erkannt werden und so das angeborene Immunsystem stimulieren. Mehrere Studien zeigen, dass VLP Präparationen, die mithilfe von Hefezellen (Tsunetsugu-Yokota et al. 2003) oder dem Baculovirus-Expressionssystem (Buonaguro et al. 2006, Speth et al. 2008) hergestellt wurden, humane APC zur Hochregulierung von Maturationsmarkern und zur Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen anregen.

In dieser Arbeit wurden Pr55<sup>Gag</sup> VLP aus zwei unterschiedlichen Expressionssystemen, dem Säuger- (*mammalian*) und dem baculoviralen Expressionssystem, in Bezug auf ihre immunstimulatorische Wirkung auf humane MDDC (*monocyte derived dendritic cells*) verglichen und auf ihre immunogenen Komponenten untersucht.

## D.2. Vergleich der immunstimulatorischen Eigenschaften von Pr55<sup>Gag</sup> VLP aus zwei verschiedenen Expressionssystemen

Bisher wurden Pr55<sup>Gag</sup> VLP meist in Insektenzellen mittels eines gut etablierten Baculovirus-Expressionssystem (baculovirale VLP (bvVLP)) in großen Mengen hergestellt. Die Vorteile dieses Systems liegen in der einfachen Handhabung, den hohen Ausbeuten an VLP und der Möglichkeit einer LPS-freien Produktion. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass diese Präparationen noch quantitative Spuren von Baculoviren oder deren Komponenten und Insektenzellbestandteile enthalten, da die gängigen Aufreinigungsmethoden keine Unterscheidung zwischen Virionen und VLP ermöglichen oder baculovirale Proteine direkt in die Partikel eingebaut werden.

Um den Einfluss dieser Komponenten besser untersuchen zu können, wurden Pr55<sup>Gag</sup> VLP via transients Transfektion in eukaryontischen 293T Zellen produziert (Säuger-VLP (*mammalian* VLP, mVLP)). Diese Präparationen, die frei von baculoviralen Proteinen oder Insektenzellbestandteilen sind, wurden bezüglich ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften mit den baculoviralen VLP verglichen. Dabei zeigte sich nach 48-stündiger Inkubation von humanen *monocyte derived dendritic cells* (MDDC) mit mVLP kein Effekt auf die Hochregulierung von Maturationsmarkern oder auf die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Die mVLP wurden also nicht von den MDDC als Alarmsignal erkannt.

Dahingegen reagierten die humanen dendritischen Zellen auf die Stimulation mit bvVLP mit einer deutlichen Hochregulierung von CD80, CD86 und HLA-DR sowie einer starken Produktion der Zytokine IL-6, TNF und IFN- $\alpha$  und einer mäßigen Sekretion von IL-10 und IL-12p70. Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von Speth et al. 2008, in der bvVLP humane PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) zur Produktion von proinflammatorischen (IL-6, TNF), antiinflammatorischen (IL-10) und Th1-polarisierenden (IFN- $\gamma$ ) Zytokinen sowie von GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und MIP-1 $\alpha$  und Monozyten zur Hochregulation von MHC-II Molekülen und den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 anregten (Speth et al. 2008). Buonaguro et al. berichteten über die Hochregulierung der Maturationsmarker CD80, CD83, CD86 und HLA-DR sowie über die erhöhte Produktion der Zytokine TNF, IL-6, IL12p70 und IL-10 nach Stimulation von humanen MDDC mit baculoviralen VLP, die mit einem gp120 Protein eines HIV-1 Isolats des Subtyps A aus Uganda pseudotypisiert worden waren (Buonaguro et al. 2006).

### D.2.1. Bedeutung der TLR-2 und TLR-4 Signalwege bei der Maturation und Aktivierung von MDDC durch bvVLP

Die Mitglieder der IL-1 Rezeptor/Toll-like Rezeptor (TLR) Superfamilie sind Schlüsselmediatoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Akira et al. 2001). *Toll*, das als erstes Mitglied dieser Superfamilie identifiziert wurde, war ursprünglich in Fliegenembryonen als ein Faktor der dorsoventralen Achsenbildung entdeckt worden. Später zeigte sich, dass *Toll* an den Mechanismen der Abwehr von Pathogenen beteiligt war (Lemaitre et al. 1996). In Säugern existiert eine Familie von TLRs und spielt eine wichtige Rolle nicht nur in der Erkennung einer Reihe von infektiösen Pathogenen und deren Produkten, sondern auch beim Schutz vor Infektionen. Bislang wurden 13 TLR Familienmitglieder und ihre zugehörigen Liganden identifiziert. Beispielsweise erkennt TLR-4 Lipopolysaccharide (LPS) (Hoshino et al. 1999), TLR-2 dagegen Peptidoglykane (PGN) und Lipopeptide (Aliprantis et al. 1999, Brightbill et al. 1999, Takeuchi et al. 1999, Underhill et al. 1999). TLR-9 ist für die Erkennung von bakterieller DNA und CpG-Motiven notwendig (Hemmi et al. 2000) (Abb.D.1).

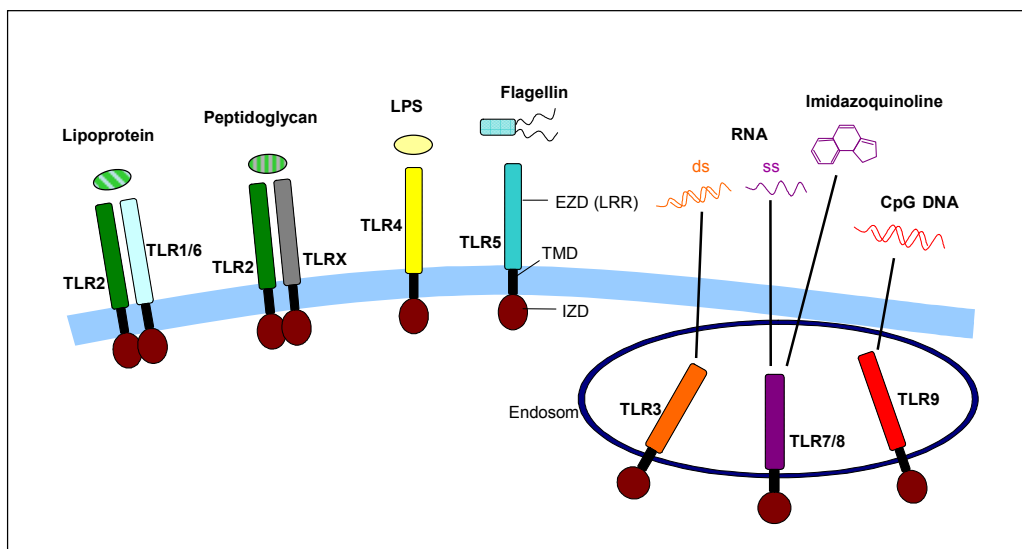


Abb. D.1: Schematische Darstellung verschiedener Toll-like Rezeptoren mit den jeweils zugehörigen Liganden

Abkürzungen: ds: doppelsträngig; ss: einzelsträngig; EZD: extrazelluläre Domäne; IZD: intrazelluläre Domäne; LRR: *leucin-rich repeats*; TMD: Transmembrandomäne

Für HPV (humanes Papillomavirus) basierte VLP konnte gezeigt werden, dass sie die Maturation und Aktivierung von dendritischen Zellen (*dendritic cells* (DC)) über

einen TLR-4 abhängigen Weg induzieren (Lenz et al. 2001, Lenz et al. 2003, Yan et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden über HIV-VLP aus dem Hefezell-Expressionssystem berichtet, die DC teilweise über den TLR-2 Signalweg aktivieren (Tsunetsugu-Yokota et al. 2003). Buonaguro et al. untersuchten die Stimulation von humanen MDDC mit bvVLP auf diese beiden TLR abhängigen Wege und zeigten, dass die beobachtete Maturation und Aktivierung der Zellen TLR-2 und TLR-4 unabhängig erfolgte (Buonaguro et al. 2006).

### **D.3. Untersuchung der bvVLP Präparationen auf immunstimulatorische Bestandteile**

#### **D.3.1. Einfluss von Insektenzellbestandteilen auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC**

Bei der Herstellung von VLP im Baculovirus-Expressionssystem werden Insektenzellen mit rekombinanten Baculoviren infiziert und anschließend die Überstände aufgereinigt. Dabei können Bestandteile der Insektenzellen wie Lipide, Nukleinsäuren oder Proteine in die Überstände gelangen, die bei der Aufreinigung durch Ultrazentrifugation nicht komplett entfernt werden. Diese Komponenten werden möglicherweise vom angeborenen Immunsystem als Alarmsignale erkannt. So kann beispielsweise DNA aus Insektenzellen eine schwache aber detektierbare Aktivierung von APC auslösen (Sun et al. 1997). In dieser Arbeit wurden bvVLP mithilfe von High Five™ Zellen hergestellt. Die Überstände nicht infizierter High Five™ Zellen wurden bei den Stimulationsversuchen als Kontrolle eingesetzt. Dabei zeigte sich nur eine moderate Maturation und Aktivierung von MDDC, die den starken stimulatorischen Effekt der bvVLP Präparation nicht erklärt.

#### **D.3.2. Einfluss von kontaminierenden Baculoviren auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC**

Die Aufreinigung der bvVLP Präparationen geschieht durch Ultrazentrifugation über ein Saccharosekissen. Dabei wird nicht zwischen baculoviralen VLP und Virionen unterschieden, so dass Spuren kontaminierender Baculoviren in der Präparation verbleiben können.



Baculoviren sind doppelsträngige DNA Viren, die für Insekten pathogen sind und eine Reihe von Arthropoden infizieren. Ihr Nukleocapsid ist stabförmig und enthält ein großes supercoiled DNA Genom von 88-160 kbp. Die Viren erhalten ihre Hülle bei der Abschnürung von der Wirtszelle. In die Virushülle wird das Glykoprotein gp64 eingebaut. Wildtyp-Baculoviren waren als Biopestizid sehr attraktiv, da sie Insekten infizieren, aber apathogen für Wirbeltiere und Pflanzen sind. Das Interesse für diese Viren begann zu wachsen, als das Baculovirus-Expressionssystem für rekombinante Proteine zu human- und veterinärmedizinischen Zwecken entwickelt wurde (Bédard et al. 1994).

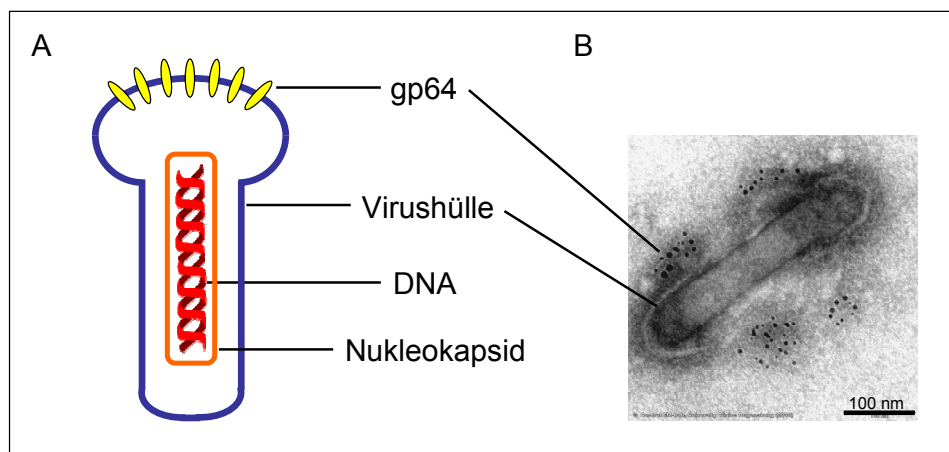


Abb. D.2: Darstellung eines Baculovirus

Das stabförmige Nukleocapsid enthält ein großes DNA Genom. Durch Abschnürung von der Wirtszelle erhalten die Viren ihre Hülle, in die das Glykoprotein gp64 eingebaut wird.

- (A) Schematische Darstellung
- (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Baculoviren starke Immunantworten in Mäusen hervorrufen. AcNPV (*autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) bewirkte eine Stimulation von Säugerzellen zur Interferon-Produktion und verlieh Mäusen einen effektiven Schutz vor letalen Enzephalomyocarditis-Virusinfektionen (Gronowski et al. 1999). Abe et al. fanden heraus, dass die nasale Inokulation von AcNPV eine starke Antwort des angeborenen Immunsystems auslöste und Mäuse vor Influenza A und B Viren schützte (Abe et al. 2003). Des Weiteren konnten adjuvante Eigenschaften von Baculoviren festgestellt werden, da sie humorale und zelluläre Immunantworten gegen gleichzeitig applizierte

Antigene, Maturation von dendritischen Zellen und die Produktion inflammatorischer Zytokine hervorriefen (Hervas-Stubbs et al. 2007).

Wie bereits in vorangegangenen Promotionsarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Simon Bredl, Ludwig Deml) war auch die in dieser Arbeit verwendete bvVLP Präparation mit Baculoviren kontaminiert, wie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abb. C.13) deutlich zeigen. Stimulationsversuche mit Wildtyp-Baculoviren ergaben einen eindeutigen Effekt auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC in der gleichen Weise wie er bei den bvVLP festzustellen war. Außerdem konnte die Dosisabhängigkeit dieses Effekts gezeigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Kontamination der bvVLP durch Baculoviren eine zentrale Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielt. Inwiefern die VLP per se immunstimulatorisch wirken, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und würde eine strikte Auftrennung der Präparation in VLP und Virionen voraussetzen.

### **D.3.3. Bedeutung des baculoviralen Hüllproteins gp64**

Das Hauptprotein der baculoviralen Hülle ist das Glykoprotein gp64, ein Membran-Fusionsprotein (siehe Abb. D.2). Gp64 ist für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle und für die Zell zu Zell Übertragung *in vitro* und *in vivo* notwendig (Blissard 1996, Braunagel et al. 1994, Hefferon et al. 1999, Monsma et al. 1996, Volkman 1986). Dabei induziert das pH-abhängige Glykoprotein im sauren Milieu des Endosoms die Membranfusion (Hefferon et al. 1999, Monsma et al. 1996, Blissard et al. 1992). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Baculoviren auch Säugerzellen infizieren, sich aber nicht in diesen vermehren können (Boyce et al. 1996). Die hierfür nötige Adhäsion an die Zellen und die anschließende Membranfusion erfolgten ebenfalls über das gp64 Protein. Zudem ist bekannt, dass gp64 Mannose, Fucose und N-Acetyl-Glukosamin-Reste enthält (Jarvis et al. 1995). Es wurde vermutet, dass gp64 mit dem Mannoserezeptor, der vornehmlich auf Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird, wechselwirkt. So könnten diese professionellen antigenpräsentierenden Zellen die VLP über ihre Mannoserezeptoren, die eine wichtige Rolle in der Induktion angeborener Immunantworten spielen (Apostolopoulos et al. 2001), erkennen und sie durch Phago- bzw. Makropinozytose aufnehmen (Abe et al. 2003). Das gp64 Protein konnte auch auf der Oberfläche der bvVLP nachgewiesen werden (siehe Abb. C.14) und könnte somit ein Grund für die

besseren stimulatorischen Eigenschaften dieser VLP sein. Außerdem beobachteten Gronowski et al. eine wichtige Rolle von gp64 bei der Induktion von Immunantworten durch AcNPV (Gronowski et al. 1999).

Um den Einfluss von gp64 auf die Stimulation von MDDC genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Säuger-VLP (mVLP) mit dem Glykoprotein pseudotypisiert und mit den Zellen inkubiert. Hierbei konnte keine Hochregulierung von Maturationsmarkern und keine Produktion von Zytokinen festgestellt werden. Folglich scheint das Glykoprotein gp64 auf der Oberfläche von VLP per se keinen direkten Einfluss auf die Stimulation des angeborenen Immunsystems zu haben.

Dagegen konnte in den Stimulationsversuchen mit CFDA-gelabelten VLP gezeigt werden, dass die mit gp64 pseudotypisierten mVLP wesentlich stärker von den MDDC aufgenommen wurden als die reinen Gag-mVLP, wie sowohl die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen als auch die FACS-Analyse deutlich zeigen (siehe Abb.C.24). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass gp64 auf der Oberfläche der VLP die Aufnahme in die Zellen erleichtert.

Ähnliche Ergebnisse zeigt eine Studie von Abe et al., in der eine Virus-Mutante des AcNPV ohne das Hüllprotein gp64 seine stimulatorischen Eigenschaften in Bezug auf die Aktivierung von Zellen des murinen Immunsystems verlor. Jedoch konnte beobachtet werden, dass gp64 per se nicht immunstimulatorisch wirkte, sondern vielmehr für die Membranfusion und Internalisierung des viralen Genoms wichtig war (Abe et al. 2005).

#### **D.3.4. Einfluss baculoviraler DNA auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC**

Weiterhin stellten Abe et al. in dieser Studie fest, dass die DNA von AcNPV das murine Immunsystem über einen TLR-9 abhängigen Weg aktivierte und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine anregte. Hierbei war die Internalisierung der DNA mittels Liposomen nötig (Abe et al. 2005).

Ähnliche Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bei den Stimulationsversuchen humaner MDDC mit baculoviraler DNA erzielt werden. Dazu wurde DNA aus Wildtyp-Baculoviren isoliert und mit oder ohne *FuGENE® HD Transfection Reagent*, das die Aufnahme der DNA in die Zelle erleichtert, mit humanen MDDC inkubiert. Nur DNA, die zusammen mit *FuGENE®* verabreicht worden war, bewirkte eine Hochregulierung

der Maturationmarker CD80, CD86 und HLA-DR, sowie eine gesteigerte Sekretion der Zytokine IL-6, TNF und IFN- $\alpha$  und zeigte damit das gleiche Aktivierungsmuster wie die bvVLP und die Wildtyp-Baculoviren. Nackte oder verdaute DNA sowie FuGENE® alleine induzierten keine Immunreaktion. Dies kann als deutliches Indiz dafür gewertet werden, dass die DNA kontaminierender Baculoviren die stimulatorische Komponente der bvVLP Präparation darstellt und dass die DNA nicht auf der Zelloberfläche als Alarmsignal erkannt wird, sondern die Aufnahme in innere Zellkompartimente notwendig ist. Dies scheint durch das baculovirale Hüllprotein gp64 gewährleistet zu sein. Hierzu würde auch die Beobachtung passen, dass die Denaturierung von gp64 durch UV-Bestrahlung die Fähigkeit von AcNPV zur Induktion inflammatorischer Zytokine reduziert und die Zugabe von Liposomen diese Fähigkeit wiederherstellt (Abe et al. 2005). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Aktivierung und Maturation der MDDC durch baculovirale DNA TLR-9-abhängig oder -unabhängig erfolgte.

#### **D.4. Mögliche DNA-Erkennungswege des angeborenen Immunsystems**

##### **D.4.1. Aktuelle Kenntnisse über die TLR-9-abhängige und -unabhängige Erkennung von DNA**

Die DNA in Mikroben oder körpereigenen Zellen befindet sich normalerweise innerhalb der Kern- oder Mitochondrienmembran in eukaryontischen Zellen bzw. der Zellwand in Bakterien und ist somit streng von der Erkennung durch das Immunsystem abgeschieden. Bei der Infektion durch Bakterien oder Viren wie auch bei der Zerstörung körpereigener Zellen wird jedoch DNA freigesetzt und kann vom angeborenen Immunsystem erkannt werden.

Bislang war TLR-9 als der einzige bekannte Rezeptor für immunstimulatorische DNA beschrieben (Ishii et al. 2006). TLR-9 ist ein membrangebundener Rezeptor in der Zelle. Hemmi et al. beschrieben erstmals die Funktion des humanen TLR-9, indem sie zeigten, dass er bakterielle unmethylierte CpG DNA, aber keine körpereigene DNA erkennt (Hemmi et al. 2000). Weitere Studien lassen darauf schließen, dass sich TLR-9 in Endosomen befindet, wobei seine Liganden-Bindestelle ins Innere des Endosoms zeigt und somit vom Zytoplasma abgewandt ist (Hemmi et al. 2000, Häcker et al. 1998). Im humanen Immunsystem findet man TLR-9 in erster Linie in pDC (*plasmacytoid dendritic cells*), einem speziellen Zelltyp, der bei viralen

Infektionen große Mengen an Typ I Interferonen produziert (Wagner, 2004). Der Rezeptor ist in ruhenden Zellen nicht aktiv. Er befindet sich im endoplasmatischen Reticulum in nicht-stimulierten pDC. Die Internalisierung von CpG DNA induziert die Translokation von TLR-9 zu Endolysosomen und die nachfolgende Aktivierung (Leifer et al. 2004, Latz et al. 2004). Im Endosom findet die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor statt. Nach Ansäuerung und Maturation des Endosoms und damit verbundener Abspaltung der Ektodomäne des TLR-9 erhält der Rezeptor seine volle Funktion und setzt eine Signalkaskade in Gang (Park et al. 2008, Ewald et al. 2008), die in der Transkription von IFN- $\alpha$ -Genen und Aktivierung von NF $\kappa$ B resultiert (Uematsu et al. 2005).

Doch seit der Entdeckung von TLR-9 gibt es auch zunehmend Hinweise darauf, dass mikrobielle und auch körpereigene DNA über einen TLR-unabhängigen Weg erkannt werden kann. Beispielsweise ruft die Infektion von TLR-9-defizienten Zellen mit DNA-Viren wie HSV-1 (Herpes simplex Virus 1) oder intrazellulären Bakterien, die eine zytoplasmatische Phase in ihrem Lebenszyklus haben, wie *Listeria monocytogenes*, immer noch DNA-gebundene Typ I Interferonantworten hervor (Stetson et al. 2006, Hochrein et al. 2004). Des Weiteren aktiviert angehäuften DNA in DNase II-defizienten Makrophagen, welche die aufgenommene DNA von apoptotischen Zellen nicht mehr beseitigen können, die Expression von Typ I Interferon-Genen über einen TLR-9-unabhängigen Weg (Okabe et al. 2005, Yoshida et al. 2005). Schließlich führt auch die Transfektion von Zellen mit synthetischer doppelsträngiger DNA TLR-9-unabhängig zu Typ I Interferon- und anderen Antworten des angeborenen Immunsystems (Ishii et al. 2006, Stetson et al. 2006). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass ein oder mehrere zytoplasmatische DNA Sensoren existieren, die Antworten des angeborenen Immunsystems, vor allem die Induktion von Typ I Interferonen, auslösen können.

Vor kurzem wurde ein DNA Sensor und Aktivator des angeborenen Immunsystems beschrieben und als DNA-abhängiger Aktivator von Interferon-regulatorischen Faktoren (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* (DAI)) benannt (früher als DLM-1 oder ZBP1 bezeichnet) (Takaoka et al. 2007). Die Expression der DAI mRNA kann durch Typ I Interferone induziert werden. Das DAI Protein enthält drei DNA-Bindedomänen (Fu et al. 1999, Takaoka et al. 2007), die alle an den DNA-vermittelten Immunantworten beteiligt sind (Wang et al. 2008). DAI befindet sich hauptsächlich im Zytosol und seine Überexpression in L929 Zellen, einer murinen

Fibroblasten-Zelllinie, führte zur Erhöhung der IFN- $\alpha/\beta$ -, IL-6- und CXCL10-Level als Antwort auf poly(dA-dT)-poly(dT-dA) (B-DNA)-Stimulation (Ishii et al. 2006, Takaoka et al. 2007) oder der IFN- $\beta$  mRNA als Antwort auf Bakterien- und Kälber-Thymus-DNA sowie poly(dG-dC)-poly(dC-dG) (Z-DNA) (Takaoka et al. 2007). Auf der anderen Seite wurde durch die Ausschaltung des DAI Proteins in diesen Zellen die B-DNA-vermittelte Aktivierung dieser Gene gehemmt und die angeborene Immunantwort auf bakterielle oder virale DNA reduziert (Takaoka et al. 2007). Die Zusammenschau dieser verschiedenen Beobachtungen lässt erkennen, dass DAI tatsächlich als zytosolischer DNA-Sensor und Aktivator des angeborenen Immunsystems fungiert. Der genaue Weg der Signalkaskade, die durch die Bindung von DNA an DAI ausgelöst wird, ist noch nicht gänzlich geklärt. Möglicherweise ist ein neues Adaptermolekül, genannt STING/MITA (*stimulator of interferon genes/mediator of IRF3 activation*) beteiligt (Ishikawa et al. 2008, Zhong et al. 2008). Die Signalkaskade endet in der Transkription von Typ I Interferon-Genen und der Aktivierung von NF $\kappa$ B (Takaoka et al. 2007).

Nachfolgende Studien zeigten außerdem zusätzliche Mechanismen der DNA-Erkennung und Immunsystemaktivierung sowie der negativen Regulierung DNA-vermittelter Immunantworten auf (Ishii et al. 2008, Wang et al. 2008).

#### **D.4.2. Erkennung baculoviraler DNA durch humane MDDC**

Unter den humanen dendritischen Zellen ist eine TLR-9-Expression bislang nur bei den pDC bekannt (Wagner, 2004). Es war jedoch unklar, ob auch die *ex vivo* generierten MDDC TLR-9 exprimieren bzw. die Expression während des Reifungsprozesses nach Stimulation mit bvVLP verstärkt wird. Da der Stimulationsversuch von TLR-9-exprimierenden pDC mit bvVLP ebenfalls eine starke IFN- $\alpha$ -Produktion auslöste, die nach Zusammenschau der übrigen Ergebnisse auf die verunreinigende baculovirale DNA zurückzuführen war, lag die Vermutung nahe, dass auch die Stimulation der MDDC durch die DNA TLR-9-abhängig war. Zudem enthält die baculovirale DNA ähnlich wie bakterielle DNA zahlreiche CpG-Motive. Die Anwesenheit von TLR-9 auf unstimulierten oder mit DNA stimulierten MDDC mittels eines TLR-9-Antikörpers konnte jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, da der verwendete Antikörper nicht funktionstüchtig war (unveröffentlichte Ergebnisse).

Es steht jedoch fest, dass die baculovirale DNA in den MDDC eine andere Signalkaskade auslöst als LPS, da die Stimulation mit DNA in einer IFN- $\alpha$ -Produktion resultiert, die durch LPS nicht induzierbar ist.

Die neuere Kenntnis über den TLR-unabhängigen DNA-Sensor DAI und dessen Lokalisation im Zytosol, zusammen mit der Tatsache, dass das baculovirale gp64 die Freisetzung der baculoviralen DNA in das Zytosol bewirkt, zeigen eine andere Möglichkeit der Erkennung baculoviraler DNA durch MDDC auf. In nachfolgenden Arbeiten bleibt zu klären, ob MDDC TLR-9 exprimieren oder ob die Erkennung der baculoviralen DNA über DAI oder andere zytosolische DNA-Sensoren erfolgt.

#### **D.5. Mögliche Wege der Aufnahme und Prozessierung der baculoviralen VLP**

Die im baculoviralen Expressionssystem produzierten VLP führen zu einer starken Maturation und Aktivierung von humanen MDDC. Dazu müssen die Partikel aufgenommen, in Einzelteile zerlegt und weiterverarbeitet werden bis schließlich die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden erfolgt. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit und aktueller Erkenntnisse aus der Forschung ergeben sich mehrere Möglichkeiten für diese Prozessierungs- und Aktivierungswege (Abb. D.3).

Die VLP können über Endozytose aufgenommen, im Endolysosom (EL) degradiert und die einzelnen Antigene in den MHC-II Prozessierungs- und Präsentationsweg eingeschleust werden (Abb. D.3 (1) roter Pfad). Eine andere Möglichkeit ist die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der VLP mithilfe von gp64 (Abb. D.3 (2) blauer Pfad). Hierbei erfolgt eine durch gp64 getriggerte Membranfusion im Endolysosom und somit die Freisetzung der Gag-Moleküle in das Zytosol. Nach der Prozessierung durch das Proteasom (P) werden die Pr55<sup>Gag</sup> Epitope im endoplasmatischen Reticulum (ER) auf MHC-I Moleküle geladen und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert.

Ebenso können über den Rezeptor-vermittelten Weg Baculoviren aufgenommen werden (Abb. D.3 (3)). Anschließend wird die baculovirale DNA vom endosomalen Toll-like-Rezeptor-9 erkannt (Abb. D.3 (3a)) oder nach gp64-getriggelter Membranfusion erfolgen die Freisetzung der DNA in das Zytosol sowie die Erkennung über den zytosolischen DNA-Sensor DAI (Abb. D.3 (3b)). Beide Wege enden in der Aktivierung der Transkription und Produktion von inflammatorischen Zytokinen und IFN- $\alpha$ .

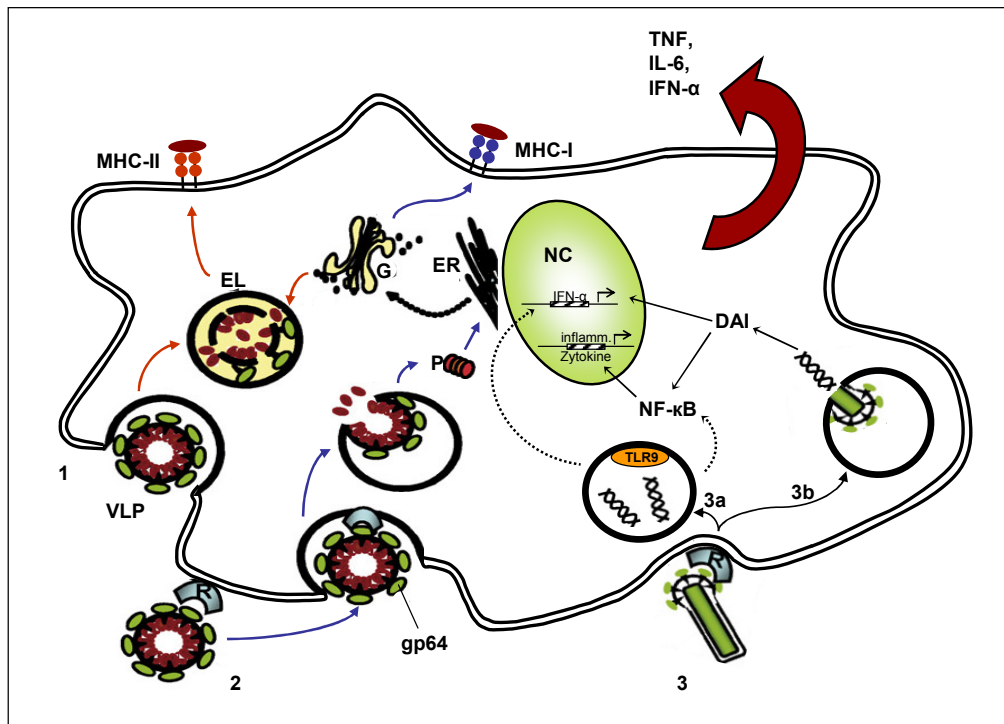


Abb. D.3: Schematische Darstellung der möglichen Wege der Aktivierung von dendritischen Zellen durch baculovirale VLP-Präparationen

- (1) Endozytose und Degradation des VLP im Endolysosom. Pr55<sup>gag</sup> Epitope werden auf MHC-II Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert (roter Pfad).
- (2) Rezeptor-vermittelte Aufnahme des VLP. Durch die gp64 vermittelte Membranfusion gelangt Pr55<sup>gag</sup> ins Zytosol der Zelle und kann dort durch das Proteasom degradiert werden. Pr55<sup>gag</sup> Epitope werden dann im endoplasmatischen Reticulum auf MHC-I Moleküle geladen und anschließend auf der Zelloberfläche präsentiert (blauer Pfad).
- (3) Baculoviren werden über Rezeptoren mittels gp64-vermittelter Fusion aufgenommen.
  - a) CpG-reiche baculovirale DNA wird vom endosomalen Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) erkannt und führt zur Transkription von IFN- $\alpha$ -Genen und über die Aktivierung von NF $\kappa$ B zur Transkription von Genen für weitere inflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF.
  - b) Durch die gp64 vermittelte Membranfusion gelangt baculovirale DNA ins Zytosol der Zelle und löst über den zytosolischen DNA-Sensor DAI eine Signalkaskade aus, die in der Transkription von Typ I Interferon-Genen und der Aktivierung von NF $\kappa$ B endet.

G: Golgi-Apparat; NC: Nukleus; EL: Endolysosom; ER: endoplasmatisches Reticulum; P: Proteasom.  
(Abbildung in Anlehnung an Ludwig und Wagner, 2007)



## D.6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte der Unterschied in der Immunogenität zwischen baculoviralen (bvVLP) und Säuger-VLP (mVLP) dargelegt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verunreinigung von bvVLP mit Baculoviren einen starken Einfluss auf die Maturation und Aktivierung von humanen MDDC hatte, wobei sich die baculovirale DNA als stimulatorische Komponente darstellte. Dagegen hatte das Hüllprotein gp64 per se keinen immunstimulatorischen Einfluss. Die Pseudotypisierung von mVLP mit gp64 führte jedoch zu einer verstärkten Aufnahme dieser Partikel in die dendritischen Zellen.

Es bleibt weiterhin offen über welche Wege die Erkennung der baculoviralen DNA erfolgt. Aufgrund der IFN- $\alpha$ -Produktion nach Stimulation von MDDC mit baculoviraler DNA wurde der TLR-9-abhängige Aktivierungsweg überprüft. Bisher konnte TLR-9 noch nicht in den *ex vivo* generierten MDDC nachgewiesen werden. Dies gelang auch nicht durch den in dieser Arbeit eingesetzten TLR-9 Antikörper. Somit bleibt zu klären, ob humane MDDC Toll like Rezeptor 9 exprimieren, z.B. durch Antikörper-Studien oder mRNA-Analysen, und ob die DNA-Erkennung und die nachfolgende Interferonproduktion TLR-9-abhängig oder über zytosolische DNA-Sensoren erfolgen. Des Weiteren steht die genaue Aufklärung des zytosolischen DNA-Erkennungsweges noch aus. Die einzelnen Schritte der Signalkaskade sowie die Bedeutung verschiedener Moleküle, so auch des kürzlich beschriebenen Adaptermoleküls STING/MITA, müssen noch im Detail entschlüsselt werden. Ebenso sollte die Existenz weiterer zytosolischer DNA-Erkennungswege in Betracht gezogen werden.

Außerdem bleibt unklar, ob die bvVLP per se immunstimulatorisch sind. Dazu müsste eine strenge Auftrennung in VLP und Virionen mit anschließenden Stimulationsstudien erfolgen. Da jedoch eine einfache Auftrennung nach Größe nicht möglich ist, könnte durch aufwendige Aufreinigungsschritte ein wichtiger Vorteil der VLP, nämlich die kostengünstige Produktion und hohe Ausbeute, verloren gehen.

Dass jedoch die Herstellung eines Impfstoffs mithilfe des Baculovirus-Expressionssystems funktioniert, zeigt die Einführung der HPV Vakzine *Cervarix*. Diese besteht aus einer Mischung von HPV 16 und 18 abgeleiteter VLP, die mittels rekombinanter Baculoviren produziert wurden. Die Impfung wird gut vertragen und bietet Schutz vor HPV 16/18 assoziierten *high-grade* zervikalen intraepithelialen

Neoplasien (*CIN 2* und *CIN3*) und Zervixkarzinom (Keam et al. 2008). *Cervarix* ist der erste zugelassene Impfstoff, der auf baculoviralen VLP basiert.

Schließlich sollten die baculovirusfreien, in 293T Zellen produzierten Pr55<sup>Gag</sup> VLP bezüglich ihrer Immunogenität näher untersucht und die stimulatorischen Eigenschaften verbessert werden. Dies könnte beispielsweise durch Pseudotypisierung mit fusogenen und immunogenen Partikeln oder durch die Verwendung von Adjuvantien geschehen.

Insgesamt bleiben virusähnliche Partikel sehr interessante und attraktive Kandidaten der HIV Vakzine-Forschung, wobei sie sich nicht nur durch ihre immunogenen Eigenschaften, sondern auch durch ihre Strukturstabilität und die Möglichkeit der Integration verschiedenster heterologer Moleküle auszeichnen.

## E. Zusammenfassung

Pr55<sup>gag</sup> Virus-ähnliche Partikel (VLP) stellen eine innovative Form einer HIV-Vakzine dar, die zum einen hoch-immunogene Eigenschaften aufweist und zudem gut verträglich und sicher ist. Gag VLP zeichnen sich durch eine hohe Strukturstabilität aus, wodurch sie sich hervorragend als Träger für fremde Polypeptide eignen, die dadurch dem Immunsystem präsentiert werden können. Über die Einschleusung der enthaltenen Antigene in den MHC-I und MHC-II Prozessierungs- und Präsentationsweg wird das angeborene Immunsystem aktiviert und somit die Voraussetzung für eine starke humorale und zelluläre Antwort geschaffen. Gleichzeitig bieten VLP einen hohen Sicherheitsstandard, da sie nicht infektiös und replikationsinkompetent sind. Um jedoch Partikel zu entwerfen, die eine schützende Immunantwort gegen HIV-Antigene hervorrufen, bedarf es detaillierter Kenntnisse der immunaktivierenden Eigenschaften einzelner Partikelkomponenten.

Ziel dieser Arbeit war es, VLP, die mittels zweier verschiedener Expressionssysteme produziert worden waren, bezüglich ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften zu vergleichen und einzelne immunogene Komponenten zu charakterisieren. VLP wurden zum einen mithilfe eines baculoviralen Expressionssystems generiert und zum anderen durch transiente Expression in einer Säugetierzelllinie hergestellt. Die nachfolgenden Stimulationsversuche wurden mit humanen *monocyte derived dendritic cells* (MDDC) als Vertreter des angeborenen Immunsystems durchgeführt. Ausgelesen wurde die Hochregulierung immunrelevanter Oberflächenantigene der MDDC sowie die Produktion verschiedener Zytokine.

Beide Expressionssysteme lieferten gute Ausbeuten an Pr55<sup>gag</sup> VLP, die vergleichbare biochemische Eigenschaften aufwiesen. Es ergaben sich jedoch große Unterschiede in den Stimulationsstudien: Die im Säugerzell-Expressionssystem hergestellten Partikel (mVLP) zeigten kaum immunstimulatorische Eigenschaften, wohingegen baculovirale VLP (bvVLP) eine Maturation und Aktivierung der dendritischen Zellen bewirkten. Darüber hinaus aktivierten die bvVLP die Produktion von IFN- $\alpha$ , welches in diesem Zusammenhang bisher erstmalig für MDDC nachgewiesen werden konnte und den Hinweis auf einen neuen Stimulationsweg lieferte.

Daraufhin wurden die in Insektenzellen produzierten bvVLP auf potenzielle immunogene Komponenten bzw. Verunreinigungen untersucht. Insektenzell-

bestandteile konnten hierbei weitgehend ausgeschlossen werden. Dementgegen konnten, bedingt durch die verwendete Aufreinigungsmethode komplette Baculoviren in den Präparationen nachgewiesen werden. Wildtyp-Baculoviren erwiesen sich in nachfolgenden Stimulationsversuchen mit MDDC als vergleichbar immunstimulatorisch wie bvVLP. Als für diesen Effekt verantwortliche Komponenten der Wildtyp-Baculoviren kamen vor allem das Hüllprotein gp64 und die baculovirale DNA infrage. Da gp64 auf der Oberfläche von bvVLP nachgewiesen werden konnte, erfolgte eine Pseudotypisierung von mVLP mit dem baculoviralen Hüllprotein. In Stimulationsversuchen mit diesen Partikeln zeigte sich jedoch trotz einer gesteigerten Aufnahme dieser Partikel keine Verbesserung der Immunogenität. Aufgereinigte baculovirale DNA erwies sich hingegen als stark immunstimulatorisch, wenn sie in Kombination mit einem geeigneten Transfektionsreagenz eingesetzt wurde; dessen Aufgabe übernimmt im Kontext baculoviraler VLP das Hüllprotein gp64. Dadurch ergibt sich die Frage nach möglichen DNA-Erkennungswegen über TLR-9-abhängige oder –unabhängige zytosolische DNA-Sensoren in den MDDC, welche in weiterführenden Arbeiten geklärt werden soll.

## F. Literaturverzeichnis

Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Matsuura Y, Takaku H. (2003) Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol* 171:1133-9.

Abe T, Hemmi H, Miyamoto H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, Akira S, Matsuura Y. (2005) Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol* 79:2847-58.

Aderem A, Ulevitch RJ. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782-7.

Aiba S, Terunuma A, Manome H, Tagami H. (1997) Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. *Eur J Immunol* 27:3031-3038.

Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Pérez-Martínez G, Perez-Arellano I, Oliveira ML, Ho PL. (2006) Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl Environ Microbiol.* 72:745-52.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-80.

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285:736-9.

Allen TM, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Mothé BR, Vogel TU, Dunphy E, Liebl ME, Emerson C, Wilson N, Kunstman KJ, Wang X, Allison DB, Hughes AL, Desrosiers RC, Altman JD, Wolinsky SM, Sette A, Watkins DI. (2000) Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407:386-90.

Aloia RC, Tian H, Jensen FC. (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5181-5.

Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyr NL, Earl PL, Smith JM, Ma HL, Grimm BD, Hulsey ML, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. (2002) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* 20:1949-55.

Apostolopoulos V, McKenzie IF. (2001) Role of the mannose receptor in the immune response. *Curr Mol Med* 1:469-74.

Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V and Hauser C. (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 166:3837-3845.

Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC 2nd, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258:1935-8.

Asselin-Paturel C, Trinchieri G. (2005) Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 202:461-5.

Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Xu W, Ayehunie S, Cavacini LA, Posner MR, Katinger H, Stiegler G, Bernacky BJ, Rizvi TA, Schmidt R, Hill LR, Keeling ME, Lu Y, Wright JE, Chou TC, Ruprecht RM. (2000) Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 6:200-6.

- Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, Bronson R, Greene MF, McClure HM, Martin LN, Ruprecht RM. (1999) Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med* 5:194-203.
- Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Santra S, Peyerl FW, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Gorgone DA, Montefiori DC, Lewis MG, Wolinsky SM, Letvin NL. (2002) Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 415:335-9.
- Barouch DH. (2008) Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature* 455:613-9.
- Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, Bilska M, Craiu A, Zheng XX, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Nickerson CE, Trigona WL, Punt K, Freed DC, Guan L, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG, Emini EA, Shiver JW, Letvin NL. (2000) Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 290:486-92.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
- Barré-Sinoussi F. (1996) HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348:31-5.
- Betts MR, Krowka J, Santamaria C, Balsamo K, Gao F, Mulundu G, Luo C, N'Gandu N, Sheppard H, Hahn BH, Allen S, Frelinger JA. (1997) Cross-clade human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in HIV-infected Zambians. *J Virol* 71:8908-11.
- Binley JM, Lybarger EA, Crooks ET, Seaman MS, Gray E, Davis KL, Decker JM, Wycuff D, Harris L, Hawkins N, Wood B, Nathe C, Richman D, Tomaras GD, Bibollet-Ruche F, Robinson JE, Morris L, Shaw GM, Montefiori DC, Mascola JR. (2008) Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. *J Virol* 82:11651-68.
- Blancou P, Chenciner N, Ho Tsong Fang R, Monceaux V, Cumont MC, Guétard D, Hurtrel B, Wain-Hobson S. (2004) Simian immunodeficiency virus promoter exchange results in a highly attenuated strain that protects against uncloned challenge virus. *J Virol* 78:1080-92.
- Blissard GW, Wenz JR. (1992) Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* 66:6829-35.
- Blissard GW. (1996) Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology* 20:73-93.
- Blumberg BS, Millman I, London WT. (1985) Ted Slavin's blood and the development of HBV vaccine. *N Engl J Med* 312:189.
- Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, D'Sousa E, van Wheelley C, Vyakarnam A. (2003) CD4 responses to conserved HIV-1 T helper epitopes show both negative and positive associations with virus load in chronically infected subjects. *Clin Exp Immunol* 134:454-63.
- Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Pfeffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM. (1997) Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 3:205-11.
- Boyce FM, Bucher NL. (1996) Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2348-52.
- Braunagel SC, Summers MD. (1994) Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. *Virology* 202:315-28.

- Bredl Simon (2005) Mitogene Eigenschaften von HIV-1 Pr55<sup>Gag</sup> virusähnlichen Partikeln zur Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, Maitland M, Norgard MV, Plevy SE, Smale ST, Brennan PJ, Bloom BR, Godowski PJ, Modlin RL. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-6.
- Brossart P, Bevan MJ. (1997) Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90:1594-9.
- Bryant M, Ratner L. (1990) Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:523-7.
- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, Del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN; Step Study Protocol Team. (2008) Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372:1881-93.
- Buonaguro L, Racioppi L, Tornesello ML, Arra C, Visciano ML, Biryahwaho B, Sempala SD, Giraldo G, Buonaguro FM. (2002) Induction of neutralizing antibodies and cytotoxic T lymphocytes in Balb/c mice immunized with virus-like particles presenting a gp120 molecule from a HIV-1 isolate of clade A. *Antiviral Res* 54:189-201.
- Buonaguro L, Tornesello ML, Tagliamonte M, Gallo RC, Wang LX, Kamin-Lewis R, Abdelwahab S, Lewis GK, Buonaguro FM. (2006) Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J Virol* 80:9134-43.
- Buseyne F, Le Gall S, Boccaccio C, Abastado JP, Lifson JD, Arthur LO, Rivière Y, Heard JM, Schwartz O. (2001) MHC-I-restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat Med* 7:344-9.
- Bédard C, Kamen A, Tom R, Massie B. (1994) Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high-density batch cultures. *Cytotechnology* 15:129-38.
- Casimiro DR, Chen L, Fu TM, Evans RK, Caulfield MJ, Davies ME, Tang A, Chen M, Huang L, Harris V, Freed DC, Wilson KA, Dubey S, Zhu DM, Nawrocki D, Mach H, Troutman R, Isopi L, Williams D, Hurni W, Xu Z, Smith JG, Wang S, Liu X, Guan L, Long R, Trigona W, Heidecker GJ, Perry HC, Persaud N, Toner TJ, Su Q, Liang X, Youil R, Chastain M, Bett AJ, Volkin DB, Emini EA, Shiver JW. (2003) Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* 77:6305-13.
- Catanzaro AT, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Gu L, Martin JE, Novik L, Chakrabarti BK, Butman BT, Gall JG, King CR, Andrews CA, Sheets R, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS; Vaccine Research Center 006 Study Team. (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 candidate vaccine delivered by a replication-defective recombinant adenovirus vector. *J Infect Dis* 194:1638-49.
- Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. (2005) Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* 433:834-41.
- Chong SY, Egan MA, Kutzler MA, Megati S, Masood A, Roopchand V, Garcia-Hand D, Montefiori DC, Quiroz J, Rosati M, Schadeck EB, Boyer JD, Pavlakis GN, Weiner DB, Sidhu M, Eldridge JH, Israel ZR. (2007) Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine* 25:4967-82.

- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 5:1219-26.
- Currier JR, deSouza M, Chanbancherd P, Bernstein W, Birx DL, Cox JH. (2002) Comprehensive screening for human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes and definition of degenerate epitopes restricted by HLA-A0207 and -C(W)0304 alleles. *J Virol* 76:4971-86.
- Delchambre M, Gheysen D, Thines D, Thiriart C, Jacobs E, Verdin E, Horth M, Burny A, Bex F. (1989) The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J* 8:2653-60.
- Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H, Wagner R. (1997) Recombinant human immunodeficiency Pr55gag virus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic T-cells and neutralizing antibodies. *Virology* 235:26-39.
- Deml L, Speth C, Dierich MP, Wolf H, Wagner R. (2005) Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol Immunol* 42:259-77.
- Dorfman T, Luban J, Goff SP, Haseltine WA, Göttinger HG. (1993) Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *J Virol* 67:6159-69.
- Durali D, Morvan J, Letourneur F, Schmitt D, Guegan N, Dalod M, Saragosti S, Sicard D, Levy JP, Gomard E. (1998) Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *J Virol* 72:3547-53.
- Emini EA, Koff WC. (2004) AIDS/HIV. Developing an AIDS vaccine: need, uncertainty, hope. *Science* 304:1913-4.
- Evans DT, Desrosiers RC. (2001) Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. *Immunol Rev* 183:141-58.
- Evans DT, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J, da Silva J, Allen TM, Horton H, Venham JE, Rudersdorf RA, Vogel T, Pauza CD, Bontrop RE, DeMars R, Sette A, Hughes AL, Watkins DI. (1999) Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med* 5:1270-6.
- Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, Barton GM. (2008) The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature* 456:658-62.
- Fanning SL, George TC, Feng D, Feldman SB, Megjugorac NJ, Izaguirre AG, Fitzgerald-Bocarsly P. (2006) Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN- $\alpha$  production. *J Immunol* 177:5829-39.
- Feeney ME, Tang Y, Pfafferoth K, Roosevelt KA, Draenert R, Trocha A, Yu XG, Verrill C, Allen T, Moore C, Mallal S, Burchett S, McIntosh K, Pelton SI, St John MA, Hazra R, Klennerman P, Altfeld M, Walker BD, Goulder PJ. (2005) HIV-1 viral escape in infancy followed by emergence of a variant-specific CTL response. *J Immunol* 174:7524-30.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF, Plebanski M. (2004) Size-dependent immunogenicity: therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J Immunol* 173:3148-54.
- Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. (1999) Latent infection of CD4<sup>+</sup> T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5:512-7.
- Fling SP, Gregerson DS. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* 155:83-88.



- Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF; rgp120 HIV Vaccine Study Group. (2005) Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* 191:654-65.
- Frahm N, Adams S, Kiepiela P, Linde CH, Hewitt HS, Lichterfeld M, Sango K, Brown NV, Pae E, Wurcel AG, Altfeld M, Feeney ME, Allen TM, Roach T, St John MA, Daar ES, Rosenberg E, Korber B, Marincola F, Walker BD, PJ, Brander C. (2005) HLA-B63 presents HLA-B57/B58-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes and is associated with low human immunodeficiency virus load. *J Virol* 79:10218-25.
- Franke EK, Yuan HE, Bossolt KL, Goff SP, Luban J. (1994) Specificity and sequence requirements for interactions between various retroviral Gag proteins. *J Virol* 68:5300-5.
- Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, Martin MA. (1994) Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* 68:5311-20.
- Fu Y, Comella N, Tognazzi K, Brown LF, Dvorak HF, Kocher O. (1999) Cloning of DLM-1, a novel gene that is up-regulated in activated macrophages, using RNA differential display. *Gene* 240:157-63.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-7.
- Gallo RC. (2005) The end or the beginning of the drive to an HIV-preventive vaccine: a view from over 20 years. *Lancet* 366:1894-8.
- Garber DA, Silvestri G, Feinberg MB. (2004) Prospects for an AIDS vaccine: three big questions, no easy answers. *Lancet Infect Dis* 4:397-413.
- Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. (2007) Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 356:1928-43.
- Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. (1987) Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156:171-6.
- Gelderblom HR. (1991) Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5:617-637.
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M. (1989) Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59:103-12.
- Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP. (2006) A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 24:4062-81.
- Goulder PJ, Watkins DI. (2004) HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 4:630-40.
- Goulder PJ, Addo MM, Altfeld MA, Rosenberg ES, Tang Y, Govender U, Mngqundaniso N, Annamalai K, Vogel TU, Hammond M, Bunce M, Coovadia HM, Walker BD. (2001) Rapid definition of five novel HLA-A\*3002-restricted human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte epitopes by elispot and intracellular cytokine staining assays. *J Virol* 75:1339-47.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Wolf H, Wagner R. (2000) Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol* 74:10822-6.

- Graham BS, Koup RA, Roederer M, Bailer RT, Enama ME, Moodie Z, Martin JE, McCluskey MM, Chakrabarti BK, Lamoreaux L, Andrews CA, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ; Vaccine Research Center 004 Study Team. (2006) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *J Infect Dis* 194:1650-60.
- Grgacic EV, Anderson DA. (2006) Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 40:60-5.
- Griffiths JC, Harris SJ, Layton GT, Berrie EL, French TJ, Burns NR, Adams SE, Kingsman AJ. (1993) Hybrid human immunodeficiency virus Gag particles as an antigen carrier system: induction of cytotoxic T-cell and humoral responses by a Gag:V3 fusion. *J Virol* 67:3191-8.
- Grommé M, Neefjes J. (2002) Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39:181-202.
- Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KC, Garotta G, Schreiber RD. (1999) Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol* 73:9944-51.
- Guan Y, Whitney JB, Detorio M, Wainberg MA. (2001) Construction and in vitro properties of a series of attenuated simian immunodeficiency viruses with all accessory genes deleted. *J Virol* 75:4056-67.
- Haffar O, Garrigues J, Travis B, Moran P, Zarling J, Hu SL. (1990) Human immunodeficiency virus-like, nonreplicating, gag-env particles assemble in a recombinant vaccinia virus expression system. *J Virol* 64:2653-9.
- Haffar OK, Smithgall MD, Moran PA, Travis BM, Zarling JM, Hu SL. (1991) HIV-specific humoral and cellular immunity in rabbits vaccinated with recombinant human immunodeficiency virus-like gag-env particles. *Virology* 183:487-95.
- Harari A, Bart PA, Stöhr W, Tapia G, Garcia M, Medjitna-Rais E, Burnet S, Cellerai C, Erlwein O, Barber T, Moog C, Liljestrom P, Wagner R, Wolf H, Kraehenbuhl JP, Esteban M, Heeney J, Frachette MJ, Tartaglia J, McCormack S, Babiker A, Weber J, Pantaleo G. (2008) An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J Exp Med* 205:63-77.
- Harding CV, Song R. (1994) Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153:4925-33.
- Harrer T, Harrer E, Barbosa P, Kaufmann F, Wagner R, Brüggemann S, Kalden JR, Feinberg M, Johnson RP, Buchbinder S, Walker BD. (1998) Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol* 161:4875-81.
- Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. (1999) CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9305-10.
- Heath WR, Carbone FR. (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.
- Hefferon KL, Oomens AG, Monsma SA, Finnerty CM, Blissard GW. (1999) Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* 258:455-68.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-5.
- Henderson LE, Bowers MA, Sowder RC 2nd, Serabyn SA, Johnson DG, Bess JW Jr, Arthur LO, Bryant DK, Fenselau C. (1992) Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences. *J Virol* 66:1856-65.
- Hervas-Stubbs S, Rueda P, Lopez L, Leclerc C. (2007) Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J Immunol* 178:2361-9.

- Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H. (2004) Herpes simplex virus type-1 induces IFN- $\alpha$  production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11416-21.
- Hong SS, Boulanger P. (1993) Assembly-defective point mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor phenotypically expressed in recombinant baculovirus-infected cells. *J Virol* 67:2787-98.
- Hoshikawa N, Kojima A, Yasuda A, Takayashiki E, Masuko S, Chiba J, Sata T, Kurata T. (1991) Role of the gag and pol genes of human immunodeficiency virus in the morphogenesis and maturation of retrovirus-like particles expressed by recombinant vaccinia virus: an ultrastructural study. *J Gen Virol* 72:2509-17.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749-52.
- Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. (1998) CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* 17:6230-40.
- Ishii KJ, Akira S. (2006) Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol* 27:525-32.
- Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7:40-8.
- Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi O, Takeshita F, Coban C, Akira S. (2008) TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 451:725-9.
- Ishikawa H, Barber GN. (2008) STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455:674-8.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. (1998) Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol* 10:349-50.
- Jarvis DL, Finn EE. (1995) Biochemical analysis of the N-glycosylation pathway in baculovirus-infected lepidopteran insect cells. *Virology* 212:500-11.
- Johnson RP, Lifson JD, Czajak SC, Cole KS, Manson KH, Glickman R, Yang J, Montefiori DC, Montelaro R, Wyand MS, Desrosiers RC. (1999) Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation. *J Virol* 73:4952-61.
- Jowett JB, Hockley DJ, Nermut MV, Jones IM. (1992) Distinct signals in human immunodeficiency virus type 1 Pr55 necessary for RNA binding and particle formation. *J Gen Virol* 73:3079-86.
- Karacostas V, Nagashima K, Gonda MA, Moss B. (1989) Human immunodeficiency virus-like particles produced by a vaccinia virus expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8964-7.
- Karpenko LI, Nekrasova NA, Ilyichev AA, Lebedev LR, Ignatyev GM, Agafonov AP, Zaitsev BN, Belavin PA, Seregin SV, Danilyuk NK, Babkina IN, Bazhan SI. (2004) Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated *Salmonella* strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen. *Vaccine* 22:1692-9.
- Kattenbeck B, von Pöblitzki A, Rohrhofer A, Wolf H, Modrow S. (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 particle formation by alterations of defined amino acids within the C terminus of the capsid protein. *J Gen Virol* 78:2489-96.

- Keam SJ, Harper DM. (2008) Human papillomavirus types 16 and 18 vaccine (recombinant, AS04 adjuvanted, adsorbed) [Cervarix]. *Drugs* 68:359-72.
- Khorchid A, Halwani R, Wainberg MA, Kleiman L. (2002) Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction. *J Virol* 76:4131-7.
- Kong Q, Richter L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y. (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11539-44.
- Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68:4650-5.
- Kuroda MJ, Schmitz JE, Charini WA, Nickerson CE, Lifton MA, Lord CI, Forman MA, Letvin NL. (1999) Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* 162:5127-33.
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-59.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227:680-685.
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 5:190-8.
- Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. (2004) TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol* 173:1179-83.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83.
- Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR, Schiller JT. (2001) Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166:5346-55.
- Lenz P, Thompson CD, Day PM, Bacot SM, Lowy DR, Schiller JT. (2003) Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol* 106:231-7.
- Letvin NL. (2002) Strategies for an HIV vaccine. *J Clin Invest* 110:15-20.
- Li Y, Svehla K, Louder MK, Wycuff D, Phogat S, Tang M, Migueles SA, Wu X, Phogat A, Shaw GM, Connors M, Hoxie J, Mascola JR, Wyatt R. (2009) Analysis of neutralization specificities in polyclonal sera derived from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 83:1045-59.
- Lifson JD, Rossio JL, Piatak M Jr, Bess J Jr, Chertova E, Schneider DK, Coalter VJ, Poore B, Kiser RF, Imming RJ, Scarzello AJ, Henderson LE, Alvord WG, Hirsch VM, Benveniste RE, Arthur LO. (2004) Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:772-87.
- Lifson JD, Rossio JL, Piatak M Jr, Parks T, Li L, Kiser R, Coalter V, Fisher B, Flynn BM, Czajak S, Hirsch VM, Reimann KA, Schmitz JE, Ghayeb J, Bischofberger N, Nowak MA, Desrosiers RC, Wodarz D. (2001) Role of CD8(+) lymphocytes in control of simian immunodeficiency virus infection and resistance to rechallenge after transient early antiretroviral treatment. *J Virol* 75:10187-99.
- Liu J, Kjekken R, Mathiesen I, Barouch DH. (2008) Recruitment of antigen-presenting cells to the site of inoculation and augmentation of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccine immunogenicity by in vivo electroporation. *J Virol* 82:5643-9.

- Liu YJ. (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23:275-306.
- Lopes LM, Chain BM. (1992) Liposome-mediated delivery stimulates a class I-restricted cytotoxic T cell response to soluble antigen. *Eur J Immunol* 22:287-90.
- Ludwig C, Wagner R. (2007) Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol* 18:537-45.
- Luo L, Li Y, Cannon PM, Kim S, Kang CY. (1992) Chimeric gag-V3 virus-like particles of human immunodeficiency virus induce virus-neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10527-31.
- Lynch JA, deSouza M, Robb MD, Markowitz L, Nitayaphan S, Sapan CV, Mann DL, Bix DL, Cox JH. (1998) Cross-clade cytotoxic T cell response to human immunodeficiency virus type 1 proteins among HLA disparate North Americans and Thais. *J Infect Dis* 178:1040-6.
- Malim MH, Emerman M. (2001) HIV-1 sequence variation: drift, shift, and attenuation. *Cell* 104:469-72.
- Manome H, Aiba S, Tagami H. (1999) Simple chemicals can induce maturation and apoptosis of dendritic cells. *Immunology* 98:481-490.
- Marquet R, Baudin F, Gabus C, Darlix JL, Mougé M, Ehresmann C, Ehresmann B. (1991) Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism. *Nucleic Acids Res* 19:2349-57.
- Martinon F, Gras-Masse H, Boutillon C, Chirat F, Deprez B, Guillet JG, Gomard E, Tartar A, Levy JP. (1992) Immunization of mice with lipopeptides bypasses the prerequisite for adjuvant. Immune response of BALB/c mice to human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Immunol* 149:3416-22.
- Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, Beary H, Hayes D, Frankel SS, Bix DL, Lewis MG. (2000) Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 6:207-10.
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. (1996) Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5335-40.
- Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. (1998) Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 72:164-9.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307:178-80.
- McMichael A, Hanke T. (2002) The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nat Rev Immunol* 2:283-91.
- McMichael AJ, Rowland-Jones SL. (2001) Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410:980-7.
- Meerloo T, Sheikh MA, Bloem AC, de Ronde A, Schutten M, van Els CA, Roholl PJ, Joling P, Goudsmit J, Schuurman HJ. (1993) Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. *J Gen Virol* 74:129-35.
- Melief CJ. (2003) Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *Eur J Immunol* 33:2645-54.
- Mergener K, Fäcke M, Welker R, Brinkmann V, Gelderblom HR, Kräusslich HG. (1992) Analysis of HIV particle formation using transient expression of subviral constructs in mammalian cells. *Virology* 186:25-39.

- Miller CJ, Li Q, Abel K, Kim EY, Ma ZM, Wietgreffe S, La Franco-Scheuch L, Compton L, Duan L, Shore MD, Zupancic M, Busch M, Carlis J, Wolinsky S, Haase AT. (2005) Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 79:9217-27.
- Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. (1996) The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J Virol* 70:4607-16.
- Montefiori DC, Safrit JT, Lydy SL, Barry AP, Bilska M, Vo HT, Klein M, Tartaglia J, Robinson HL, Rovinski B. (2001) Induction of neutralizing antibodies and gag-specific cellular immune responses to an R5 primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 in rhesus macaques. *J Virol* 75:5879-90.
- Mulvania T, Haynes B, Hedin D. (2004) A flow cytometric assay for rapid, accurate determination of baculovirus titers. *Bioprocess. J* 3:47-53.
- O'Connor D, Friedrich T, Hughes A, Allen TM, Watkins D. (2001) Understanding cytotoxic T-lymphocyte escape during simian immunodeficiency virus infection. *Immunol Rev* 183:115-26.
- Okabe Y, Kawane K, Akira S, Taniguchi T, Nagata S. (2005) Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* 202:1333-9.
- Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, Castellsague X, de Carvalho NS, Skinner SR, Harper DM, Hedrick JA, Jaisamrarn U, Limson GA, Dionne M, Quint W, Spiessens B, Peeters P, Struyf F, Wieting SL, et al. (2007) Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 369:2161-70.
- Pal R, Reitz MS Jr, Tschachler E, Gallo RC, Sarngadharan MG, Veronese FD. (1990) Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:721-30.
- Paliard X, Liu Y, Wagner R, Wolf H, Baenziger J, Walker CM. (2000) Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:273-82.
- Park B, Brinkmann MM, Spooner E, Lee CC, Kim YM, Ploegh HL. (2008) Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9:1407-14.
- Phillips DM, Zacharopoulos VR, Tan X, Pearce-Pratt R. (1994) Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends Microbiol* 2:454-8.
- Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, Hu D, Tappero JW, Choopanya K; Bangkok Vaccine Evaluation Group. (2006) Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* 194:1661-71.
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. (1988) Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242:1168-71.
- Priddy FH, Brown D, Kublin J, Monahan K, Wright DP, Lalezari J, Santiago S, Marmor M, Lally M, Novak RM, Brown SJ, Kulkarni P, Dubey SA, Kierstead LS, Casimiro DR, Mogg R, DiNubile MJ, Shiver JW, Leavitt RY, Robertson MN, Mehrotra DV, Quirk E; Merck V520-016 Study Group. (2008) Safety and immunogenicity of a replication-incompetent adenovirus type 5 HIV-1 clade B gag/pol/nef vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis* 46:1769-81.
- Reimann J, Schirmbeck R. (1999) Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev* 172:131-52.

- Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. (2003) Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4144-9.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588-93.
- Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278:1447-50.
- Rovinski B, Haynes JR, Cao SX, James O, Sia C, Zolla-Pazner S, Matthews TJ, Klein MH. (1992) Expression and characterization of genetically engineered human immunodeficiency virus-like particles containing modified envelope glycoproteins: implications for development of a cross-protective AIDS vaccine. *J Virol* 66:4003-12.
- Royer M, Cerutti M, Gay B, Hong SS, Devauchelle G, Boulanger P. (1991) Functional domains of HIV-1 gag-polyprotein expressed in baculovirus-infected cells. *Virology* 184:417-22.
- Royer M, Hong SS, Gay B, Cerutti M, Boulanger P. (1992) Expression and extracellular release of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursors by recombinant baculovirus-infected cells. *J Virol* 66:3230-5.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Sakuragi S, Goto T, Sano K, Morikawa Y. (2002) HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7956-61.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179:1109-1118.
- Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400.
- Sandefur S, Varthakavi V, Spearman P. (1998) The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag. *J Virol* 72:2723-32.
- Sather DN, Armann J, Ching LK, Mavrantoni A, Sellhorn G, Caldwell Z, Yu X, Wood B, Self S, Kalams S, Stamatatos L. (2009) Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 83:757-69.
- Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, Ott RG, Anthony RM, Zebroski H, Hurley A, Phogat A, Chakrabarti B, Li Y, Connors M, Pereyra F, Walker BD, Wardemann H, Ho D, Wyatt RT, Mascola JR, Ravetch JV, Nussenzweig MC. (2009) Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature* 458:636-40.
- Schild H, Norda M, Deres K, Falk K, Rötzschke O, Wiesmüller KH, Jung G, Rammensee HG. (1991) Fine specificity of cytotoxic T lymphocytes primed in vivo either with virus or synthetic lipopeptide vaccine or primed in vitro with peptide. *J Exp Med* 174:1665-8.
- Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallan BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8<sup>+</sup> lymphocytes. *Science* 283:857-60.
- Shiver JW, Fu TM, Chen L, Casimiro DR, Davies ME, Evans RK, Zhang ZQ, Simon AJ, Trigona WL, Dubey SA, Huang L, Harris VA, Long RS, Liang X, Handt L, Schleif WA, Zhu L, Freed DC, Persaud NV, Guan L, Punt KS, Tang A, Chen M, Wilson KA, Collins KB, Heidecker GJ, Fernandez VR, Perry HC, Joyce JG, Grimm KM, Cook JC, Keller PM, Kresock DS, Mach H, Troutman RD, Isopi LA, Williams DM, Xu Z, Bohannon KE, Volkin DB, Montefiori DC, Miura A, Krivulka GR, Lifton MA, Kuroda

- MJ, Schmitz JE, Letvin NL, Caulfield MJ, Bett AJ, Youil R, Kaslow DC, Emini EA. (2002) Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* 415:331-5.
- Singh M. (2006) No vaccine against HIV yet--are we not perfectly equipped? *Virology* 3:60.
- Smith GE, Ju G, Ericson BL, Moschera J, Lahm HW, Chizzonite R, Summers MD. (1985). Modification and secretion of human interleukin 2 produced in insect cells by a baculovirus expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8404-8408.
- Speth C, Bredl S, Hagleitner M, Wild J, Dierich M, Wolf H, Schroeder J, Wagner R, Deml L. (2008) Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Pr55gag virus-like particles are potent activators of human monocytes. *Virology* 382:46-58.
- Stetson DB, Medzhitov R. (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24:93-103.
- Stober D, Trobonjaca Z, Reimann J, Schirmbeck R. (2002) Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 32:1099-108.
- Sun S, Beard C, Jaenisch R, Jones P, Sprent J. (1997) Mitogenicity of DNA from different organisms for murine B cells. *J Immunol* 159:3119-25.
- Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 4:607-9.
- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448:501-5.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999) Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-51.
- Tobin GJ, Li GH, Williamson JC, Nagashima K, Gonda MA. (1996) Synthesis and assembly of chimeric human immunodeficiency virus gag pseudovirions. *Intervirology* 39:40-8.
- Tsunetsugu-Yokota Y, Morikawa Y, Isogai M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Nakamura T, Grassi F, Autran B, Iwamoto A. (2003) Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J Virol* 77:10250-9.
- Uematsu S, Sato S, Yamamoto M, Hirotani T, Kato H, Takeshita F, Matsuda M, Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. (2005) Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med* 201:915-23.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-5.
- Vernon SK, Murthy S, Wilhelm J, Chanda PK, Kalyan N, Lee SG, Hung PP. (1991) Ultrastructural characterization of human immunodeficiency virus type 1 Gag-containing particles assembled in a recombinant adenovirus vector system. *J Gen Virol* 72:1243-51.
- Veronese FD, Copeland TD, Oroszlan S, Gallo RC, Sarngadharan MG. (1988) Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J Virol* 62:795-801.
- Volkman LE. (1986) The 64K envelope protein of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 131:103-18.



- von Poblitzki A, Wagner R, Niedrig M, Wanner G, Wolf H, Modrow S. (1993) Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation. *Virology* 193:981-5.
- Vzorov AN, Bukrinsky MI, Grigoriev VB, Tentsov YYu, Bukrinskaya AG. (1991) Highly immunogenic human immunodeficiency viruslike particles are produced by recombinant vaccinia virus-infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 7:29-36.
- Wagner H, Bauer S. (2006) All is not Toll: new pathways in DNA recognition. *J Exp Med* 203:265-8.
- Wagner H. (2004) The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 25(7):381-6.
- Wagner R, Deml L, Schirmbeck R, Niedrig M, Reimann J, Wolf H. (1996) Construction, expression, and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology* 220:128-40.
- Wagner R, Deml L, Schirmbeck R, Reimann J, Wolf H. (1994) Induction of a MHC class I-restricted, CD8 positive cytolytic T-cell response by chimeric HIV-1 virus-like particles in vivo: implications on HIV vaccine development. *Behring Inst Mitt* 23-34.
- Wagner R, Fliessbach H, Wanner G, Motz M, Niedrig M, Deby G, von Brunn A, Wolf H. (1992) Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol* 127:117-37.
- Wang CT, Chou YC, Chiang CC. (2000) Assembly and processing of human immunodeficiency virus Gag mutants containing a partial replacement of the matrix domain by the viral protease domain. *J Virol* 74:3418-22.
- Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T. (2008) Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5477-82.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM. (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* 422:307-12.
- Wiesel Melanie (2006) Einfluss des baculoviralen gp64 Oberflächenproteins auf die Immunogenität einer partikel-basierenden HIV-Vakzine. Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg.
- Wille-Reece U, Flynn BJ, Loré K, Koup RA, Kedl RM, Mattapallil JJ, Weiss WR, Roederer M, Seder RA. (2005) HIV Gag protein conjugated to a Toll-like receptor 7/8 agonist improves the magnitude and quality of Th1 and CD8+ T cell responses in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15190-4.
- Wille-Reece U, Flynn BJ, Loré K, Koup RA, Miles AP, Saul A, Kedl RM, Mattapallil JJ, Weiss WR, Roederer M, Seder RA. (2006) Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med* 203:1249-58.
- Wolf H, Modrow S, Soutschek E, Motz M, Grunow R, Döbl H. (1990) Production, mapping and biological characterisation of monoclonal antibodies to the core protein (p24) of the human immunodeficiency virus type 1. *AIFO* 1:24-29.
- Wyatt R, Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8.
- Yan M, Peng J, Jabbar IA, Liu X, Filgueira L, Frazer IH, Thomas R. (2005) Activation of dendritic cells by human papillomavirus-like particles through TLR4 and NF-kappaB-mediated signalling, moderated by TGF-beta. *Immunol Cell Biol* 83:83-91.

- Yewdell JW, Norbury CC, Bennink JR. (1999) Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8<sup>+</sup> T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73:1-77.
- Yoshida H, Okabe Y, Kawane K, Fukuyama H, Nagata S. (2005) Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat Immunol* 6:49-56.
- Young KR, Smith JM, Ross TM. (2004) Characterization of a DNA vaccine expressing a human immunodeficiency virus-like particle. *Virology* 327:262-72.
- Yuan X, Yu X, Lee TH, Essex M. (1993) Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor. *J Virol* 67:6387-94.
- Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, Lei C, He X, Zhang L, Tien P, Shu HB. (2008) The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity* 29:538-50.
- Zhou T, Xu L, Dey B, Hessel AJ, Van Ryk D, Xiang SH, Yang X, Zhang MY, Zwick MB, Arthos J, Burton DR, Dimitrov DS, Sodroski J, Wyatt R, Nabel GJ, Kwong PD. (2007) Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature* 445:732-7.
- Zhou W, Parent LJ, Wills JW, Resh MD. (1994) Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids. *J Virol* 68:2556-69.
- Zinkernagel RM. (2002) On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? *Eur J Immunol* 32:2385-92.

**G. Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AcMNPV	<i>autographa californica mononuclear polyhedrosis virus</i>
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom ( <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AvHRP	<i>avidin-horseradish peroxidase conjugate</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bvVLP	baculovirale Pr55 <sup>Gag</sup> VLP
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Capsid-Protein
ca.	circa
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFDA SE	<i>carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester</i>
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalie Virus
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T lymphocytes</i> )
CXCL	Chemokin CXC Liganden
CY5	Cyanin5
Da	Dalton
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cells</i>
DEAE	Diethylamino Ethanol

---

DMEM	<i>Dullbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic-acid</i> )
ds	doppelsträngig ( <i>double-stranded</i> )
ECD	energiegebundener Farbstoff ( <i>energy-coupled dye</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titriplex)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein ( <i>envelope</i> )
et al.	und andere
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Konstante für die Schwerebeschleunigung der Erde
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glycoprotein
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie ( <i>highly active antiretroviral therapy</i> )
HBV	Hepatitis B Virus
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen ( <i>surface</i> )-Antigen
HeBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Merettich-Peroxidase)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	Wasser aus einer Milliporeanlage
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IN	Integrase
i.v.	intravenös
k	kilo
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter

---

LI	Linkerprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter oder milli
M	molar (Mol pro Liter)
MA	Matrixprotein
mA	Milliampere
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDDC	<i>monocyte derived dendritic cells</i>
MHC	<i>major-histocompatibility complex</i>
MIP-1 $\alpha$	<i>macrophage inflammatory protein-1 alpha</i>
MITA	<i>mediator of IRF3 activation</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mVLP	Säuger ( <i>mammalian</i> )-VLP
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> ) oder Mittelwert
$\mu$	mikro
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
n	nano
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NC	Nukleocapsid
Nef	<i>negative regulatory factor</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells</i>
NNRTI	nicht-nukleosidaler Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	nukleosidaler Reverse-Transkriptase-Inhibitor
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p	Protein oder pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PAMPs	<i>pathogen- associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cells</i>
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> Ionen in einer Lösung
PI	Proteaseinhibitor
pol	Polymerase
PR	Protease
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
ss	einzelsträngig ( <i>single-stranded</i> )
SSC	<i>side scatter</i>
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
SV40	<i>simian virus 40</i>
Tab.	Tabelle
Taq	DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th	T Helfer
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 ( <i>tween-tris buffered saline</i> )
U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )

UV	Ultraviolett
V	Volt
Vif	<i>viral infectivity factor</i>
VLP	virusähnlicher Partikel ( <i>virus like particle</i> )
Vpr	<i>viral protein rapid</i>
Vpu	<i>viral protein out</i>
VSV-G	vesikuläres Stomatitisvirus-Oberflächenprotein G
wt	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel
ZBP1	Z-DNA-bindendes Protein 1
ZP	Zytoplasma

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf sowie seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.

Bei Prof. Dr. Ralf Wagner bedanke ich mich für das interessante Thema dieser Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Josef Köstler für die tolle Betreuung der Arbeit und die gute Unterstützung in Rat und Tat. Vielen Dank auch fürs Korrekturlesen meiner Arbeit.

Danke an die ganze AG Wagner für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Vor allem möchte ich Denijal, Helga und Kathi für ihre Hilfe zu jeder Zeit und die schönen Mittagspausen danken.

Danke auch meinen lieben Laborkollegen, Asli, Kristina und ganz besonders Simon. Mit euch war immer für lustige Unterhaltung und musikalische Gestaltung des Laboralltags gesorgt.

Ein ganz lieber Dank geht an meine Familie und meinen Freund Tobi. Ohne den guten Zusammenhalt und eure liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen hätte ich diese Arbeit nie geschafft.



## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Sertl  
 Vorname: Simone Christina Erika  
 Geburtsdatum: 20.12.1983  
 Geburtsort: Weiden i.d.Opf.  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Adresse: Bürgermeister-Prechtel-Str. 48  
 92637 Weiden

### Schul Ausbildung

1990 – 1994 Grundschule Neuhaus/Windischeschenbach  
 1994 – 2003 Elly-Heuss-Gymnasium, Weiden  
 06/2003 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

2003 – 2010 Studium der Humanmedizin an der Universität  
 Regensburg  
 09/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 05/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Beruf

Seit 09/2010 Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie und  
 operative Intensivmedizin, Kliniken Nordoberpfalz AG